

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie

Charité-Virchow-Klinikum

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

(Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken)

HABILITATIONSSCHRIFT

Apoptose und Seneszenz in Tumorentstehung und Therapieantwort

zur Erlangung der Venia legendi

für das Fach Innere Medizin

an der Charité

Medizinische Fakultät der

Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Dr. med. Clemens Alexander Schmitt

aus Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. M. Debatin, Ulm

2. Prof. Dr. med. Th. von Zglinicki, Newcastle, Großbritannien

Datum der Habilitation: 17. Juli 2003

Zusammenfassung

Die schlechte Prognose der meisten disseminierten Tumorerkrankungen ist häufig in einer vorbestehenden oder erworbenen Resistenz gegenüber Zytostatika begründet. Da die meisten Zytostatika mit zellulären Strukturen interagieren, war lange angenommen worden, dass der antineoplastische Effekt unmittelbar durch massive Zellschädigung bewirkt wird. Hieraus folgte, dass Chemoresistenz auf Mechanismen beruhen müsse, welche das Zytostatikum an der Wechselwirkung mit seiner intrazellulären Zielstruktur hindern. Arbeiten der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass die meisten Zytostatika indirekt über DNA-Schädigung ein relativ uniformes, genetisch kodiertes Zelltod-Programm auslösen, demzufolge postuliert wurde, dass auch Apoptosedefekte für „Multi-Drug-Resistenz“ verantwortlich sein könnten. Allerdings ist der tatsächlich Beitrag zytostatika-induzierter Apoptose am Therapieerfolg nicht geklärt, wobei der Wahl geeigneter Testsysteme eine wesentliche Bedeutung für diese Kontroverse zuzukommen scheint.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist daher die Etablierung eines transgenen Lymphom-Modells, in welchem chemotherapeutische Effekte an spontan entstandenen Tumoren mit definierten genetischen Läsionen in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Mutationen in apoptose-relevanten Genloci wie *p53*, *INK4a/ARF* oder *bcl2* sowohl die Manifestation *myc*-transgener Lymphome dramatisch beschleunigen, als auch den Therapieerfolg kompromittieren. Neben Apoptose wurde darüberhinaus prämaturne Seneszenz, ein terminaler Zellzyklus-Arrest, als prognose-relevantes Chemotherapie-Effektorprogramm identifiziert.

Damit dokumentiert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Zusammenhang von Gendefekten, die während der Tumorigenese erworben wurden, und später evidenter Chemoresistenz, wobei manche Mutationen bereits vor Zytostatika-Exposition Resistenz begründen können. Die Identifikation und pharmakogenomische Charakterisierung potentiell resistenz-vermittelnder Gene und Mutationen in relevanten Testsystemen wird für die Entwicklung spezifischerer, aber weniger toxischer „targeted Therapeutics“ von großer Bedeutung sein.

Schlagwörter:

Apoptose – Chemoresistenz – Lymphom – Mausmodell – Seneszenz

Abstract

Intrinsic or acquired chemoresistance is the major cause for the adverse outcome of disseminated malignancies. The fact that most anticancer agents bind to subcellular targets prompted the assumption that drug-induced cytotoxicity must be a direct consequence of severe cellular damage. Hence, chemoresistance was thought to arise from mechanisms that prevent or disrupt the drug-target interaction. By contrast, more recent data suggested that DNA damage caused by most, if not all, anticancer agents may trigger a relatively uniform, genetically encoded cell death program. In turn, defects in the apoptotic machinery should account for multi-drug resistance as well. However, due to technical limitations of current test systems, it has been difficult to assess the overall contribution of apoptotic cell death to treatment outcome.

In the studies presented here, a transgenic mouse lymphoma model was established in order to exploit drug responses of spontaneously developed malignancies

growing at their natural sites but harboring defined genetic defects. Using this model, alterations in apoptosis-related gene loci such as *p53*, *INK4a/ARF* or *bcl2* result in both dramatic acceleration of *myc*-driven lymphomagenesis and compromised treatment responses. Importantly, not only apoptosis, but premature senescence, a terminal cell-cycle arrest, was found to impact on treatment outcome.

In essence, this work describes an important connection between cancer genes and cancer therapy, i.e. genetic defects acquired during tumorigenesis may already co-select for chemoresistance prior to any drug encounter. The identification and pharmacogenomic evaluation of resistance conferring candidate genes and mutations using adequate test systems is likely to play a key role in the development of novel, more specific but less toxic so called „targeted Therapeutics“.

Keywords:

Apoptosis – chemoresistance – lymphoma – mouse model – senescence

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung – Die Problematik	
1.1	Tumorthherapie und Prognose	7
1.2	Chemoresistenz als Prä- und Post-Schädigungsproblem	7
1.3	Tumorbiologie und Therapiesensitivität	8
1.3.1	Aktivierte Onkogene als „driving force“ der malignen Transformation	8
1.3.2	Checkpoint-Kontrolle regelhafter Zellzyklus-Passage	8
1.3.3	Apoptose als zelluläres Failsafe-Programm	9
1.3.4	Seneszenz als zelluläres Failsafe-Programm	9
1.3.5	p53 als Wächter der zellulären Integrität	10
1.4	Genetische Defekte in Failsafe-Programmen und Post-Damage-Multi-Drug-Resistenz	11
1.4.1	Manifeste Malignome haben Mutationen in Failsafe-Programmen	11
1.4.2	Failsafe-Inaktivierung durch „extragene“ Mutationen	12
1.4.3	Failsafe-Defekte interferieren mit Chemosensitivität	12
1.5	Restriktionen konventioneller Testsysteme	13
1.6	Fragestellung	14
2	Hauptteil – Eigene Arbeiten	
2.1	Die <i>Ep-myc</i> -transgene Lymphom-Maus als physiologisches und versatiles Chemotherapie-Modell	15
2.2	<i>p53</i> - und <i>INK4a/ARF</i> -Mutationen akzelerieren die Lymphomgenese und tragen zu Chemoresistenz bei	16
2.3	Apoptosedefekte kompromittieren die Chemosensitivität von Tumoren <i>in vivo</i>	18
2.4	Apoptose ist die einzige <i>p53</i> -Effektorfunktion zur Suppression <i>myc</i> -initiiertter Lymphome	19
2.5	Seneszenz ist ein prognostisch relevantes <i>p53</i> - und <i>p16^{INK4a}</i> -kontrolliertes Therapie-Erfolgsprogramm	20
3	Diskussion und Kritische Wertung	
3.1	The Hallmarks of Cancer	23
3.2	The Lifelines of Cancer	23
3.3	Stellenwert prämaturer Seneszenz in Tumorthherapie und Prognose	24
3.4	Nebenprodukte werden zur Hauptsache	25
3.5	Von Mäusen zu Menschen	26
3.6	„Mining the Genome“: Gene, Proteine und ihre Funktionen	27

Zusammenfassung und Perspektiven	28
Literaturverzeichnis	29
Abkürzungsverzeichnis	40
Danksagungen	41
Lebenslauf	42
Anhang	45
Eidesstattliche Erklärung	46

1 Einleitung – Die Problematik

1.1 Tumorthherapie und Prognose

Die medikamentöse Behandlung mit konventionellen „antineoplastischen“ Substanzen stellt nach wie vor die Therapie der Wahl für die meisten disseminierten Tumorerkrankungen und insbesondere hämatologische Neoplasien dar. Nahezu allen konventionellen Zytostatika ist dabei gemeinsam, dass sie mit dem regelhaften Ablauf des Zellzyklus interferieren. Die quantitativ und qualitativ bedeutendste Gruppe stellen hier neben Spindelgiften, Anti-Mikrotubulus-Agentien, Proteasom-Inhibitoren oder Translationshemmern die DNA-interagierenden Wirkstoffe dar, die auf biochemisch unterschiedliche Weise mit der DNA-Replikationsmaschinerie interferieren [1]. Basierend auf empirischen Studien sind so eine Vielzahl an Monotherapien oder Kombinationsregimen entwickelt worden, die bevorzugt Zellen mit hoher mitotischer Aktivität angreifen sollen, grundsätzlich allerdings relativ geringe Spezifität und hohe Toxizität für Normalgewebe und Gesamtorganismus aufweisen. Enttäuschenderweise sind trotz vieler neuer Wirkstoffe auf dem Gebiet der konventionellen Chemotherapie über mehrere Dekaden kaum substantielle Prognoseverbesserungen erzielt worden. Beispielsweise ist das 1976 vorgestellte CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) zur Behandlung vieler hochmaligner Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bis dato nicht von einem überlegenen Regime abgelöst worden [2, 3]. Selbst Hochdosis-Therapien, bei denen dosis-limitierende Knochenmarkstoxizität durch hämatopoietischen Stammzell-Support kompensiert wird, konnten in den meisten Tumorentitäten nicht zu verlängertem Patientenüberleben führen [4, 5]. Ebenso ist der Erfolg sogenannter „Next-Line“-Therapien nach Versagen eines Initialregimes als Ausdruck des im wesentlichen ähnlichen Wirkmechanismus der meisten konventionellen Zytostatika begrenzt. Damit stellt *a priori*- oder erworbene Chemoresistenz den entscheidenden prognose-limitierenden Faktor für Patienten mit disseminierter Tumorerkrankung dar.

1.2 Chemoresistenz als Prä- und Post-Schädigungsproblem

Über viele Jahre war angenommen worden, dass der Angriff von Zytostatika an subzellulären Strukturen unmittelbar und unabdingbar zu einer massiven Zellschädigung führt, die mit dem Überleben der betroffenen Zelle unvereinbar ist. Folglich konzentrierte sich die Exploration von Resistenzmechanismen auf Prinzipien, die während der „Prä-Schädigungsphase“, also vor der potentiellen Interaktion eines Wirkstoffs mit seiner intrazellulären Zielstruktur, eingreifen. Neben systemischen pharmakokinetischen Aspekten wie Wirkstoff-Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit oder lokaler Wirkkonzentration und intratumoraler Verteilungshomogenität sowie der Induktion von substanz-spezifisch metabolisierenden Enzymen sind insbesondere Zytostatika-Efflux-Pumpmechanismen als Paradigmen der klinisch so häufig gesehenen „Multi-Drug-Resistenz“ (MDR) diskutiert worden [6, 7]. Entsprechende Arbeiten konnten zeigen, dass das MDR-kodierte P-Glykoprotein und verwandte Genprodukte als Transmembran-Pumpen mit breiter Substratspezifität gegenüber biochemisch unterschiedlichen Zytostatika-Klassen fungieren und somit die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration einer Vielzahl gängiger Chemotherapeutika reduzieren. Obwohl MDR-Genamplifikation oder -Überexpression in Tumoren gefunden wurde und diese auch mit Insensitivität gegenüber P-Glykoprotein-affinen Zytostatika *in vitro* korreliert werden konnten, haben dieser Resistenzmechanismus und die Wirksamkeit sogenannter „MDR-Reversal“-Pharmaka nur begrenzte klinische Signifikanz erlangt [8, 9].

Da auch gegen Zytostatika ohne P-Glykoprotein-Affinität Kreuzresistenzen auftreten, war offenkundig, dass MDR-verwandte Mechanismen allenfalls für einen

Teilaspekt des klinischen Problems verantwortlich sind. Die bekannte Tatsache, dass auch unter strahlentherapeutischer Behandlung, die wohl ähnlich wie Zytostatika in erster Linie DNA schädigt, aber gegen die keine wirklichen „Pre-Damage-Resistenzmechanismen“ existieren, ebenfalls Therapieresistenz erzeugt wird, unterstützte die Hypothese, dass nicht der Schaden selbst unumgänglich letal ist, sondern lediglich einen zellulär kontrollierten „Post-Damage“-Prozess triggert, der über das weitere Schicksal der Zelle entscheidet. In der Tat ist der durch Zytostatika erzeugte Initialschaden an zellulären Strukturen, insbesondere DNA, häufig so gering, dass er unter bestimmten Umständen reparabel ist.

1.3 Tumorbiologie und Therapiesensitivität

Wenn zelluläre Signalkaskaden die tatsächlichen Vollstreckerinstanzen des Zytostatika-Stimulus darstellen, könnten genetische Veränderungen das Therapieresultat modifizieren. Während Zellen des Normalgewebes genomisch stabil sind, sind allen Tumorzellen genetische Aberrationen immanent. Dabei verfügen etablierte Tumorzellen nicht nur über eine sehr breite genetische Variabilität bzw. Überlebensfähigkeit trotz zahlreicher Mutationen, wodurch sie für chemotherapie-induzierte Selektionsprozesse empfänglicher werden als Normalzellen. Um überhaupt das Vollbild eines neoplastisch-atypischen Phänotyps zu akquirieren, müssen Zellen bereits im Zuge der malignen Transformation eine Sequenz genetischer Krisen durchlaufen, die mit charakteristischen Defekten in zellulären Kontrollprogrammen und veränderter Chemosensitivität einhergehen.

1.3.1 Aktivierte Onkogene als „driving force“ der malignen Transformation

Malignes Wachstum entspricht einer Nettozunahme der Zellzahl und damit einer Imbalance der Homeostase von Teilungs- und Absterberate. Mitose und Apoptose sind komplex überwachte Schlüsselaufgaben der Zelle. Es gibt Hinweise, dass ein initialer Zelltod-Defekt – von embryonalen, also ohnehin expandierenden Geweben abgesehen – alleine nicht hinreichend tumorigen ist, weil die passive Reduktion der Absterberate von einer funktionierenden Proliferationskontrolle aktiv kompensiert werden kann [10, 11]. Im Gegensatz dazu sind akut aktivierte Mitogene potentiell tumorigen, da sie Proliferation autonomisieren, also von einer zellulären Gegenregulation entkoppeln. Mitogene Onkogene wie *myc* oder *ras* stellen daher typischerweise das Initialereignis der malignen Transformation dar und funktionieren als Motor der klonalen Expansion. Diese Läsionen, in denen eine intakte „Todesmaschine“ latent verfügbar ist, sind konsequenterweise hypersensitiv für Todessignale. Entsprechend konnte in Mausmodellen induzierbarer bzw. regulierbarer Onkogene demonstriert werden, dass hyperproliferative Läsionen – wenn sie hier überhaupt entstehen – während einer Initialphase potentiell reversibel sind [12, 13, 14, 15]. Es ist daher eine attraktive Hypothese, dass Tumoren in dieser frühen Progressionsphase durch die Aktivierung eines mitogenen Onkogens besonders chemosensibel werden, woraus sich die typischerweise höhere Zytostatika-Empfindlichkeit von Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe erklären könnte [16, 17, 18].

1.3.2 Checkpoint-Kontrolle regelhafter Zellzyklus-Passage

Maligne Transformation ist ein Kräftespiel zwischen onkogenen Faktoren und zellulären Gegenmaßnahmen. Tumormanifestation ist daher die Konsequenz durchbrochener Tumorsuppressor-Mechanismen, sogenannter zellulärer „Failsafe-Programme“. Aufgabe der Failsafe-Programme ist es, Zellen mit potentiell malignen Veränderungen im Pool proliferierender Zellen zu identifizieren und durch forcierten Zellzyklus-Exit deren Expansion zu verhindern. Failsafe-Programme müssen daher über einen Sensor- und einen Exekutions-Arm verfügen. Während der Zellzyklus-Passage

werden an diversen Schlüsselstellen, den sogenannten „Checkpoints“, Kriterien regelhafter Zellzyklus-Progression und DNA-Replikation abgefragt [19]. Werden Irregularitäten detektiert, ergreift die Checkpoint-Kontrolle adäquate Maßnahmen: die Zellzyklus-Passage wird arretiert und der Defekt entweder repariert, oder aber die Zelle wird durch Einschleusung in ultimative Programme wie Apoptose oder Seneszenz (siehe unten) von weiterer Proliferation definitiv ausgeschlossen [18, 20]. Aktivierte Onkogene sind daher „zweischneidige Schwerter“: die mitogene Komponente ist typischerweise mit einer pro-apoptotischen oder pro-seneszenten Komponente als Ausdruck der zellulären Gegenregulation vergesellschaftet [21, 22, 23, 24].

1.3.3 Apoptose als zelluläres Failsafe-Programm

Die Existenz einer genetisch kontrollierten Zelltod-Signalkaskade mit charakteristischen morphologischen Veränderungen wie Membran-Ausstülpungen, Kernfragmentierung und Chromatin-Kondensation ist seit über drei Dekaden bekannt [25]. Verschiedene pro-apoptotische Stimuli – aktivierte Onkogene, DNA-Schädigung, oder „Todesrezeptor“-Liganden wie Fas/CD95 und Tumornekrosefaktor [26, 27, 28] – können auf verschiedene Weise eine Sequenz intrazellulärer Effektoren aktivieren, wobei der extrinsische Rezeptor-Pathway von einer intrinsischen mitochondrialen, Cytochrom C-freisetzenden Kaskade prototypisch unterschieden wird. Nach potentieller Kreuzverschaltung der beiden Kaskaden werden in einer gemeinsamen Endstrecke Proteasen der Caspase-Familie und Nukleasen aktiviert, die den Zellsuizid in charakteristischer Weise exekutieren [29, 30]. Wichtig ist, dass diese Sequenz – ähnlich wie das Gerinnungs- oder das Komplementsystem – über multiple Kontrollmechanismen und Inhibitoren verfügt. Neben „Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs)“ und pro-apoptotischen Inhibitoren der Inhibitoren (z.B. Smac/Diablo [31]) sind vor allem die anti-apoptotischen Bcl2-Familienmitglieder *bcl2* und *bcl-xl* wichtige „Pro-Survival“-Regulatoren des Apoptose-Programms [32, 33]. Die überlebensfördernde Rolle der meisten Gegenregulatoren ist dabei weniger als ein aktiver Apoptose-Antagonismus, sondern eher als eine bedarfsgerechte Sollwertverstellung der Todesschwelle zu verstehen. So wird die Apoptose-Hemmung durch Bcl2-Überexpression nicht unter optimalen nutritiven Bedingungen, sondern erst unter Serumentzug evident [34]. Entsprechend haben *bcl2* oder *bcl-xl* trotz deren wichtiger Rolle in verschiedenen Tumorentitäten – wie beispielsweise die Bcl2-Überexpression im follikulären Lymphom [35] – kein eigentlich onkogenes Potential wie mitogene Onkogene, sondern erleichtern passiv die maligne Transformation.

Nicht alle Onkogene aktivieren Apoptose, doch kann Apoptose die charakteristische Akut-Reaktion sein. So provoziert *myc* trotz seiner mitogenen Potenz typischerweise massiv Apoptose [21]. Abhängig von den lokalen Wachstumsbedingungen, d.h. vor allem Zytokinkonzentration und Oxygenierung, ist entweder Proliferation oder Apoptose die dominierende onkogene Funktion [36, 37]. Apoptose fungiert also als onkogen-responsives Failsafe-Programm, indem entweder die Entstehung onkogen-mediierter Präkanzerosen effektiv verhindert wird oder aber – zumindest während einer prämaligen Phase – die Spontanregression der hyperplastischen Läsion eingeleitet wird [15, 38].

1.3.4 Seneszenz als zelluläres Failsafe-Programm

Im Gegensatz zu einem vorübergehenden Zellzyklus-Stopp stellt zelluläre Seneszenz einen terminalen Wachstumsblock dar, der seneszente Zellen irreversibel aus dem Pool sich aktiv teilender Zellen eliminiert. Seneszenz wurde vor mehr als vier Dekaden erstmalig von Hayflick und Moorhead beschrieben, die mit diesem Begriff der „Zellalterung“ den terminalen Teilungsstopp von kultivierten Fibroblasten nach Ausschöpfung einer endlichen Zahl an Zelldivisionen, auch „Hayflick-Limit“ genannt, charakterisierten [39]. Zugrunde liegender Mechanismus dieser „mitotischen Uhr“ ist die progressive Verkürzung und konsekutive De-Protektion der Chromosomen-Enden bei

jeder Zellteilung [40, 41], falls die Telomer-Länge nicht enzymatisch restauriert wird [42]. Phänotypisch von replikativer Seneszenz ununterscheidbar ist die akut induzierbare und daher prämaturre Seneszenz. Diese telomer-unabhängige Form der Seneszenz kann durch zelluläre Stresse wie aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoff-Spezies oder DNA-Schädigung ausgelöst werden [20, 23, 24, 43, 44]. Da seneszente Fibroblasten ein charakteristisches Genexpressionsprofil aufweisen [45] und mit α -Galaktosidase im sauren pH-Optimum (seneszenz-assoziierte SA- α -Gal-Aktivität) einen biochemischen Marker exprimieren, der in sich teilenden Zellen (und auch in „quieszenten“ Zellen in G0-Phase) nicht gefunden wird [46], wurde vermutet, dass prämaturre Seneszenz ähnlich wie Apoptose ein spezifisches, genetisch kodierte Stress-Response-Programm darstellt. In Kultur imponieren seneszente Zellen durch ihr flächiges, vakuolen-reiches Zytoplasma. Diese Zellen bleiben metabolisch aktiv, doch ist über das Schicksal seneszenten Zellen *in vivo* wenig bekannt. Während replikative Seneszenz als ein weithin akzeptierter biologischer Zustand des hohen Zellalters nach ausgeschöpftem Teilungspotential gilt, wird das Konzept prämaturer Seneszenz durchaus kontrovers als Kultur-Artefakt mit unbekannter Signifikanz *in vivo* diskutiert [47]. Es wird zwar eine Akkumulation SA- α -Gal-positiver Zellen in Gewebeproben älterer Menschen gefunden [46], doch ist unklar, inwieweit prämaturre seneszente Zellen durch Phagozytose rasch abgeräumt werden können. Zwar ist mittlerweile klar, dass p53 und die p16^{INK4a}/Rb-Achse, ARF, p15^{INK4b} und das Promyelozyten-Leukämie-Genprodukt PML eine entscheidende Rolle in der genetischen Kontrolle von prämaturer Seneszenz spielen [48, 49, 50, 51, 52], doch sind Stimulus-Effektor-Kaskaden und Querverschaltungen analog zu Apoptose-Programmen für das „Seneszenz-Netzwerk“ bisher weit weniger detailliert beschrieben.

Im Gegensatz zu pro-apoptotischen mitogenen Onkogenen gibt es Onkogene, die bevorzugt akut Seneszenz als zelluläres Failsafe-Programm auslösen. Onkogenes Ras gilt als Prototyp eines Onkogens mit seneszenten Ko-Aktivität [23]. Mehrschritt-Modelle der Spinaliom-Genese aus hyperproliferativen Läsionen legen nahe, dass initiale Ras-Aktivierung zu papillomartigen Tumoren führt, die durch Spontanregression *ad integrum* abheilen können, wenn nicht sequentiell tumor-promovierende „Failsafe“-Defekte erworben werden [53, 54]. Interessanterweise sind mitogene und pro-seneszente Pathways dabei zumindest teilweise identisch: prämaturre Seneszenz infolge onkogenem Ras wird durch den mitogenen MAP-Kinase-Signalweg eingeleitet [55]. Es ist derzeit nicht klar, ob Umgebungsfaktoren (wie für onkogenes *myc* (siehe oben) diskutiert) das Gleichgewicht zwischen mitogener Funktion und pro-seneszenter Failsafe-Gegenregulation verschieben, oder ob die transformierende Potenz dieser Onkogen-Klasse nur in Anwesenheit kooperierender Mutationen evident wird.

1.3.5 p53 als Wächter der zellulären Integrität

p53 ist der wichtigste Mediator der zellulären Wachstumskontrolle. p53 überwacht nicht nur mehrere Zellzyklus-Checkpoints, wie beispielsweise den G1-, G2- oder sogenannten Spindel-Checkpoint, sondern ist zentral an der Exekution von Zellzyklus-Arrest und Failsafe-Programmen wie Apoptose und Seneszenz beteiligt [56, 57, 58]. Darüberhinaus kontrolliert p53 mit DNA-Reparatur, Angiogenese oder chromosomaler Stabilität noch eine Reihe weiterer Funktionen, die für die Zell- und Gewebsintegrität essentiell sind. p53 fungiert als Tumorsuppressor, weil es inadäquate Proliferationssignale registriert und zelluläre Gegenmaßnahmen ergreifen kann. Signale mitogener Onkogene wie *myc* oder *ras* führen zur Aktivierung von p53, welches dann Failsafe-Programme induziert und so zur Elimination von Zellen mit onkogener Aktivierung führt [59, 60, 61]. p53-abhängige Apoptose und Seneszenz fungieren als Schlüsselmechanismen in der Suppression von Tumorbildung und –progression *in vitro* und *in vivo* [54, 62, 63]. Interessanterweise scheinen die tumorprotektive Rolle von p53 als „Wächter der zellulären Integrität“ und die damit verbundenen Failsafe-Programme ihren Preis zu fordern: Mäuse mit einer aktivierenden p53-Mutation sind zwar gegen spontane

Malignome geschützt, aber zeigen – konsistent mit einer Assoziation von Seneszenz und organismischem Altern – Zeichen einer beschleunigten körperlichen Alterung [64].

p53 ist in ein komplexes Netzwerk sogenannter „Upstream“-Regulatoren und „Downstream“-Effektoren eingebunden [57]. Ein Schlüssel-Mediator onkogener Signale zu p53 stellt beispielsweise ARF dar, welches im alternativen Leseraster (alternate reading frame) neben p16^{INK4a} (einem Inhibitor der Rb-vermittelten G1-S-Phasen-Progression) vom wichtigen Tumorsuppressor-Lokus *INK4a/ARF* kodiert wird [65, 66]. Der präzise Mechanismus der *INK4a/ARF*-Expressionsregulation ist unklar, doch onkogenes Myc, Ras oder Bcr-Abl induzieren ARF-Protein [67, 68, 69], welches Mdm2 und damit dessen Funktion als p53-ubiquitinierende E3-Ligase inhibiert [70]. Neben ARF-vermittelten onkogenen Signalen kann beispielsweise DNA-Schädigung via Proteinkinasen wie ATM, ATR, Chk1 und Chk2 zur Induktion und Aktivierung von p53 führen [71, 72]. Es ist weithin akzeptiert, dass der onkogene und der DNA-Damage-Signalweg prinzipiell parallele p53-Upstream-Kaskaden darstellen [73, 74, 75].

Die Zahl identifizierter p53-induzierbarer Gene, sogenannter „PIGs“, wächst kontinuierlich, doch ist deren funktionelle Bedeutung und klinische Signifikanz häufig noch wenig untersucht. Wie der Transkriptionsfaktor p53 als „Relais“ unterschiedliche „Upstream“-Signale – sei es von aktivierten Onkogenen oder DNA-Schädigung – überhaupt in differentielle Antwortprogramme, also in erster Linie Arrest versus Apoptose, übersetzt, ist nicht klar. Da p53 komplex über Protein-Level, subzelluläre Lokalisation und eine Phosphorylierungs-Azetylierungskaskade aktivitäts-reguliert wird [56, 76], könnte die Steuerung dieser Größen zur Aktivierung verschiedener PIG-Sets führen. Insbesondere in der Gruppe pro-apoptotischer p53-Effektoren – um neben *bax* mit *PERP*, *AIP*, *Puma* oder *Noxa* nur einige zu nennen [77, 78, 79, 80, 81] – scheint es Redundanzen und zelltyp-spezifische Kooperationen der Targetgene zu geben, die p53-mediiert Apoptose einleiten [82]. Unstrittig ist, dass „downstream“ der direkten pro-apoptotischen p53-Targets ein als „Apoptosom“ beschriebener ternärer Komplex unter Einschluß von Apaf-1 und Caspase 9 den wesentlichen Exekutor von p53-initiiert Apoptose darstellt [83, 84]. Als p53-Effektoren mit zellzyklus-arretierender Funktion sind im Gegensatz zur großen Gruppe der pro-apoptotischen PIGs nur wenige Gene identifiziert worden, unter ihnen der CDK-Inhibitor *p21* als G1- und *14-3-3* als G2/M-Arrest-Vermittler [85, 86], wobei die genauen molekularen Mechanismen von lediglich temporärem gegenüber einem Langzeit-Zellzyklus-Block nicht hinreichend verstanden sind.

1.4 Genetische Defekte in Failsafe-Programmen und Post-Damage-Multi-Drug-Resistenz

1.4.1 Manifeste Malignome haben Mutationen in Failsafe-Programmen

Es ist wahrscheinlich, dass sich kein Tumor ohne Defekt in den onkogen-konkernden Failsafe-Programmen manifestieren könnte [87]. Konsequenterweise tragen in vielen Entitäten und Modellsystemen *p53*-Mutationen zur Kanzerogenese bei [22, 88]. Konkordant mit den Beobachtungen, dass aktiviertes Myc oder die onkogene Bcr-Abl-Kinase ARF und p53 induzieren [68, 69], werden in entsprechenden manifesten Malignomen gehäuft Mutationen in diesen Tumorsuppressor-Genen nachgewiesen. Burkitt-Lymphome, die nahezu immer eine translokationsbedingte Myc-Aktivierung aufweisen, sind in etwa 30-60% der Fälle mit *p53*-Mutationen assoziiert [89, 90, 91]. In ähnlicher Weise finden sich in der Blastenkrise der typischerweise Bcr-Abl-positiven chronisch-myeloischen Leukämie *p53*-Mutationen und insbesondere *INK4a/ARF*-Deletionen [92, 93]. Da die meisten aktivierten Onkogene via ARF p53 und somit Failsafe-Programme induzieren, ist es nicht erstaunlich, dass *p53*- und *INK4a/ARF*-Alterationen die beiden am häufigsten detektierten Gendefekte in humanen Tumorentitäten darstellen

[65, 94]. Besonders eindrucksvoll ist der Mutationsdruck, der offensichtlich auf der $p16^{\text{INK4a}}$ /Rb-Achse in Ras-getriebenen Malignomen lastet: Pankreaskarzinome, in denen sehr häufig aktivierende *K-ras*-Mutationen vorliegen, weisen in nahezu 100% der Fälle sich zumeist gegenseitig ausschließende *Rb*- und *CDK4*-Mutationen sowie vor allem $p16^{\text{INK4a}}$ -Defekte auf, wobei durch Promoter-Hypermethylierung in diesem Kontext gezielt die *INK4a*-Expression und nicht das alternative Leseraster-Produkt ARF inaktiviert wird [95].

1.4.2 Failsafe-Inaktivierung durch „extragene“ Mutationen

Die Notwendigkeit, Failsafe-Mechanismen im Zuge der Tumoretablierung zu inaktivieren, erklärt nicht zwangsläufig, warum gerade *p53* und ferner *INK4a/ARF* so häufig Mutationsziel sind. In der Tat sind sogenannte „extragene“ Läsionen im *p53*-Signalweg, d.h. „upstream“, beispielsweise auf der Ebene von ARF oder Mdm2, oder „downstream“ bevorzugt in pro-apoptotischen Signalmediatoren wie Bax oder Apaf-1 beschrieben [96, 97, 98, 99, 100, 101]. Solche extragenen Defekte treten dann oft, aber keineswegs immer, nach dem Gesetz der „mutual exclusivity“ im Kontext von Wildtyp-*p53* auf [99, 102]. Ferner kann die Ko-Aktivierung einer „Pro-Survival-Aktivität“ wie Bcl2 oder Bcl-xl Myc-initiierte Tumorigenese dramatisch erleichtern [15, 103, 104]. Trotz der hohen Frequenz von *p53*-Mutationen deutet die Präsenz dieser „extragenen“ Defekte im *p53*-Pathway darauf hin, dass nicht etwa alle *p53*-kontrollierten Effektorfunktionen gleichermaßen bedeutsame Tumorsuppressor-Aufgaben wahrnehmen.

1.4.3 Failsafe-Defekte interferieren mit Chemosensitivität

Es ist seit mehr als 25 Jahren bekannt, dass zytostatika-induzierte Tumorregression mit dem Auftreten apoptotischer Zellen vergesellschaftet ist [105], wobei der Aspekt von Apoptose als einer genetisch kodierten Signalkaskade damals noch nicht hinreichend bekannt war. Im Einklang mit der Hypothese, dass Zytostatika nicht durch massive Zellschädigung *per se*, sondern als apoptotische Trigger anti-neoplastisch wirken, sollten genetische Defekte in der Apoptose-Maschinerie Chemosensitivität kompromittieren. Besonders interessant ist hierbei, dass Mutationen in pro-apoptotischen Tumorsuppressor-Programmen möglicherweise simultan zu einer „Post-Damage-Resistenz“ (siehe oben) beitragen. Die gemeinsam genutzte Apoptose-Endstrecke des onkongenen und des DNA-Damage-Pathways könnte so erklären, warum Tumoren mit bestimmten Apoptosedefekten bereits *a priori* (d.h. vor zytostatischer Ersttherapie) „multi-drug-resistent“ sind. In der Tat wurde in präklinischen Modellen ein Zusammenhang zwischen *p53*-Inaktivierung und Therapieresistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika gefunden [16, 106, 107, 108, 109, 110]. Auch komplexe Screening-Untersuchungen von Tumorzelllinien demonstrierten eine signifikante Abhängigkeit der Chemosensitivität von funktionellem *p53* [111, 112, 113]. *p53*-Wildtyp-Gentransfer konnte dabei in *p53*-defizienten Tumorzellen Chemosensitivität restaurieren [114, 115]. Obwohl klinische Studien zu weit weniger einheitlichen Ergebnissen kamen, konnte in einigen Entitäten die prognostische Relevanz des *p53*-Status gesichert werden [116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123]. Auch Überexpression von anti-apoptotischen Aktivitäten wie Bcl2 oder Bcl-xl reduzierte akute chemotherapeutische Zytotoxizität *in vitro* [124, 125], doch der klinische Einfluß dieser Faktoren auf das Langzeit-Überleben der Patienten wird kontrovers beurteilt [126, 127, 128, 129].

Apoptose ist nicht der alleinige Mechanismus, mittels dessen Zytostatika Tumorzellen eliminieren [130]. Andere letale Antwortprogramme wie Nekrose, „apoptoide“ Formen des programmierten Zelltods im Kontext spezifischer Apoptosedefekte [11] oder mitotische Katastrophe, bei der Zellen nach subletaler Schädigung noch einige Male endoreduplizieren oder nach Kurzzeit-Arrest wieder in den Zellzyklus eintreten, bevor sie als multinukleäre Zellen apoptose-ähnlich absterben [131, 132, 133] können durch Chemotherapie ausgelöst werden. Trotz der reziproken Beziehung von zytostatika-

induzierbarer Apoptose und resistenz-vermittelnden Apoptosedefekten ist daher nicht klar, inwieweit Apoptose zum klinischen „Outcome“ nach Chemotherapie beiträgt [134]. Zu dieser Unsicherheit kommt hinzu, dass Zytostatika anhaltenden Zellzyklus-Arrest auszulösen vermögen [135, 136]. DNA-Schädigung kann *in vitro* Seneszenz-Marker induzieren, doch fehlten bislang Untersuchungen über Auftreten und Relevanz von zytostatika-induzierter Seneszenz *in vivo* [43]. Tumorentwicklungsbedingte Defekte in Failsafe-Programmen wie Apoptose und Seneszenz kausal für Therapieversagen und schlechtes Patientenüberleben anzuschuldigen, ist daher eine attraktive, aber unbelegte Hypothese.

1.5 Restriktionen konventioneller Testsysteme

Da die meisten Zytostatika nicht als „targeted Therapeutics“ im Sinne eines Schlüssel-Schloß-Prinzips gegen tumorexklusive Läsionen, sondern auf dem Boden empirischer Daten entwickelt wurden, sind die molekularen Grundlagen ihres Wirkmechanismus und damit des Chemoresistenz-Problems nur unzureichend verstanden. Experimentelle Systeme zur Untersuchung genetischer Einflußfaktoren von Chemoresistenz bedienen sich in erster Linie gut charakterisierter und daher oft jahrelang passagierter, hochgradig kultur-adaptierter Tumorzelllinien. Darüberhinaus werden Therapiestudien zumeist „*in petri*“ durchgeführt, lassen also wesentliche Aspekte des Tumor-Mikromilieus *in vivo* außer acht, oder basieren auf Xenotransplantaten humaner Tumorzellen in Nacktmäusen, wo neben der Spezies-Barriere, dem hierbei notwendigen Immundefekt der Mäuse und der typischerweise ektopen Implantation wiederum häufig Multi-Passagen-Tumorzelllinien zum Einsatz kommen.

Dennoch wurden grundlegende und wegweisende Erkenntnisse über den Zusammenhang von genetischen Defekten und Therapie-Ansprechen in Zellkultur-Systemen gewonnen. Insbesondere der systematische Ansatz, den akut wachstums-inhibierenden Effekt von über 60.000 potentiell antineoplastischen Substanzen gegenüber 60 standardisierten Tumorzelllinien des National Institute of Cancer (NCI) zu testen, konnte darlegen, dass die meisten Wirkstoffe in p53-intakten Zelllinien potenter wirkten [111, 112]. Aus den mittels Mikroarray-Technik erhobenen Genexpressionsdaten dieser 60 NCI-Zelllinien ergeben sich nun neuartige bioinformatische Ansätze, auch komplexe Signalnetzwerke mit Zytostatika-Sensitivitätsprofilen mehrdimensional zu korrelieren [113, 137, 138]. Neben der problematischen Auswahl „gut charakterisierter“ Tumorzelllinien (siehe oben) erscheint es fraglich, inwieweit das Wachstumsverhalten der Zellen evaluiert binnen weniger Stunden nach Wirkstoffzusatz als valider Surrogat-Marker für den Therapieverlauf entsprechender Tumorentitäten *in vivo* fungieren kann.

Als Gold-Standard zur Testung chemotherapeutischer Langzeit-Effekte *in vitro* gelten daher klonogene Überlebensassays. Hierzu werden Zellen nach Präinkubation mit Zytostatika in niedriger Dichte im Kulturmedium ausgesät und nach Tagen bis Wochen nachweisbare Proliferationsinseln ausgezählt. Die klonogene Entstehung dieser Zellkolonien ist dabei nicht nur vom Überleben, sondern auch von der verbliebenen Teilungsfähigkeit nach Zytostatikabehandlung abhängig, da nicht-apoptotische, aber langzeit-arretierte Zellen keine signifikanten Kolonien bilden können. Insbesondere tragen klonogene Assays – im Gegensatz zu Kurzzeit-Zytotoxizitätsassays – der Annahme Rechnung, dass Apoptose zwar ein relevanter Akut-Mechanismus nach Chemotherapie sei und damit die initiale Absterberate einer Tumorzell-Population, nicht aber deren Gesamt-Überleben beeinflusse, da apoptosedefekte Tumorzellen möglicherweise lediglich verzögert untergingen [139]. Tatsächlich gelang es in zahlreichen Arbeiten nicht, mittels einfacher klonogener Überlebensassays einen Beitrag apoptose-regulierender Gene wie *p53* oder *bcl2* zur Langzeit-Therapieempfindlichkeit von Tumorzellen zu belegen [132, 140, 141, 142, 143]. Dies führte zu der interessanten Überlegung, dass

Apoptosedefekte keinen differentiellen Therapie-Beitrag leisten könnten, weil sie ohnehin immanenter Aspekt eines jeden manifesten Malignoms seien [139].

Diese Sichtweise – durchaus im Widerspruch zu Daten klinischer Untersuchungen (siehe oben) – wurde durch modifizierte klonogene Überlebensassays in Frage gestellt, in denen spezifische Aspekte des Tumor-Mikromilieus berücksichtigt wurden und die nun in der Lage waren, die Abhängigkeit des Langzeit-Therapieeffekts von anti-apoptotischen Aktivitäten zu demonstrieren [144, 145]. Durch Zusatz von Mikromilieu-Faktoren, Ko-Kultivierung mit Stromazellen oder die Erzeugung komplexer, genetisch chimärer Umgebungsbedingungen wurde dabei deutlich, dass isolierte Tumorzellen in artefiziellen Testsystemen die Biologie und Chemosensitivität natürlich wachsender Tumoren nur sehr bedingt rekapitulieren können [146, 147, 148].

Konsequenterweise sollte man erwarten, dass die Untersuchung von primärem Tumormaterial für die Beurteilung potentiell resistenz-vermittelnder Gendefekte geradezu ideal sein müsse. Allerdings stellen selbst Proben einer nosologisch eng gefaßten Entität ein genetisch sehr heterogenes und dabei uncharakterisiertes Untersuchungsgut dar. Insbesondere die Rolle nicht erfaßter „extragener“ Läsionen (siehe oben) ist für die Stratifikation des Materials problematisch, da sie einen Signalweg kompromittieren können, ohne dass Mutationen im eigentlichen Kandidatengen zum Nachweis kommen. Hierin liegt vermutlich ein wesentlicher Grund, warum es in vielen klinischen Studien nicht gelang, den p53-Status – dabei oft nur angenähert mittels Immunhistochemie und nicht via Gensequenzierung bestimmt – mit Therapieerfolg positiv zu korrelieren. Darüberhinaus ist die bioptische Gewinnung einer relevanten Anzahl (und hinreichenden Menge) an Tumorproben mit zumindest klinisch und histopathologisch vergleichbaren Erkrankungsparametern praktisch kaum zu erzielen.

1.6 Fragestellung

Nicht nur einige klinische Studien, sondern *in vitro*-Experimente, in denen kultur-naïve, primäre Zellen mit definierten genetischen Läsionen – d.h. embryonale Fibroblasten beispielsweise von *p53*-Knockout-Mäusen – durch Transduktion mit aktivierenden Onkogenen akut transformiert wurden, deuteten auf eine zentrale Bedeutung der p53-Achse für die Sensitivität gegenüber Chemotherapie hin (siehe oben). Allerdings ist keiner der bisher diskutierten experimentellen Ansätze in der Lage, die Rolle von Kandidatengen in spontan entstehenden Primärtumoren im Kontext ihres physiologischen Mikromilieus systematisch zu untersuchen. In der Tat kann bis *dato* keine einzige Arbeit belegen, dass etablierte Tumorzelllinien die Therapiesensitivität der Patienten, aus denen sie hervorgegangen sind, widerzuspiegeln vermögen. Es ist daher die Fragestellung dieser Habilitationsschrift, in einem Modellsystem primärer Tumoren mit genetisch definierten Läsionen die Kurz- und Langzeiteffekte klassischer Chemotherapie zu untersuchen und dabei insbesondere die überlappende Rolle zellulärer Kontrollprogramme unter Tumorentstehung und Tumorthherapie näher zu beleuchten.

2 Hauptteil – Eigene Arbeiten

2.1 Die *Eμ-myc*-transgene Lymphom-Maus als physiologisches und versatiles Chemotherapie-Modell

- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (1999). Apoptosis and therapy. *Journal of Pathology* 187: 127-37. [149]
- Clemens A. Schmitt, Rachel R. Wallace-Brodeur, Christine T. Rosenthal, Mila E. McCurrach, Scott W. Lowe (2000). DNA damage responses and chemosensitivity in the *Eμ-myc* mouse lymphoma model. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LXV: 499-510. [150]

Um genetische Grundlagen der Tumorentstehung und Mechanismen der Chemoresistenz in einem wirklichkeitsnahen Modell untersuchen zu können, wurde ein transplantables, onkogen-getriebenes Lymphom-Modell auf dem Boden der *Eμ-myc*-transgenen Maus etabliert [151, 152]. *Eμ-myc*-transgene Mäuse entwickeln binnen weniger Monate spontan klonale B-Zell-Lymphome mit Begleitleukämie. Das *Eμ-myc*-Transgen entspricht der t(8;14)-Translokation, wie sie häufig in humanen Lymphomen mit dereguliertem *myc* vorliegt, und wird infolge Immunglobulin-Schwerketten-Promotor-Kontrolle B-Zell-restringiert exprimiert. Darüberhinaus ähneln Spontanapoptose-Index, „Sternenhimmel-Histologie“ und Leukämie der murinen Erkrankung sehr dem Bild des humanen Burkitt-Lymphoms mit akuter lymphatischer Leukämie im Sinne einer L3-B-ALL. Das Spektrum einer größeren Zahl individueller primärer *myc*-Lymphome reflektiert dabei eine Varianz, wie sie auch durch Tumoren verschiedener Patienten, aber derselben Entität, gegeben ist. Durch Palpation der zervikalen, axillären und subskapularen Lymphknoten sowie periphere Blutaussstriche kann der Verlauf der Erkrankung in den Mäusen zuverlässig und effizient überwacht werden. Behandlung mit γ -Bestrahlung oder Zytostatika wie Cyclophosphamid oder Adriamycin führt akut zur p53-Induktion und Apoptose der Lymphomzellen *in vivo* und hat typischerweise anhaltende Remissionen zur Folge. Regelmäßige Überwachung der behandelten Tiere mittels Lymphknoten-Palpation oder Monitoring des peripheren Bluts (Leukozytenzählung, Ausstrich) erlaubt die Bestimmung der Remissionszeit, also ob und wann nach behandlungsinduzierter Remission ein Relapse auftritt. Repetitive Behandlung rekurrenter Lymphome führt über progressiv verkürzte Remissionszeiten schließlich zur Therapieresistenz und rekapituliert somit klinische Verläufe von Lymphom-Patienten unter Chemotherapie. Isolierte Lymphomzellen können kultiviert werden oder systemisch, d.h. über intravenöse Injektion, in nicht-transgene, syngene Mäuse transplantiert werden, wobei die entstehenden disseminierten Neoplasien von den Malignomen in primär-transgenen Mäusen histopathologisch ununterscheidbar sind. Der Einsatz transplanteder Mäuse ist für die akkurate Bestimmung von Remissionszeiten wichtig, um in behandelten Mäusen einen Relapse von einem transgen-induzierten Sekundär-Lymphom zu unterscheiden und erlaubt die Behandlung maligner Zellen im Umfeld normaler, nicht-transgener Lymphozyten, also in einem Kontext, wie er im Patienten mit klonaler Tumorerkrankung vorliegt. Des weiteren ermöglicht serielle Transplantation auch die „Vervielfältigung“ desselben Lymphoms in zahlreichen Empfängermäusen. Damit kann ein individuelles Lymphom mit und ohne Therapie verglichen werden, es können zu verschiedenen Zeiten nach Therapie Tumorproben gewonnen werden oder verschiedene Therapieverfahren gegenüber demselben Tumor getestet werden. Es ist technisch unmöglich, derartige Daten im Zuge der klinischen Behandlung von Lymphompatienten zu gewinnen.

Eine weitere Stärke des Modells liegt in seiner genetischen Versatilität, d.h. der Möglichkeit, Tumoren mit genetisch definierten Defekten zu erzeugen. So kann nach Kreuzung mit „Knockout“-Mäusen, d.h. Mäusen mit Keimbahn-Deletionen bestimmter Gen-Loki, in der F1-Generation der potentielle Einfluß dieser Läsion auf die Lymphom-Manifestationszeit und Tumorbilogie erfaßt werden. Prinzipiell wird hierbei ein Target-

Lokus nur heterozygot inaktiviert, so dass bei Kandidatengenomen mit mutmaßlicher Tumorsuppressor-Funktion, die selten defekt-dominant oder haploinsuffizient ist, kein genereller Phänotyp auftritt. Allerdings entspricht ein heterozygoter Gendefekt bereits dem ersten „Hit“ der klassischen „Two-Hit-Hypothese“ zur Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Lokus [153]. Damit erzeugt eine heterozygote Läsion einen *Locus minoris resistentiae*, gegen den im onkogen-aktivierten Zielgewebe erleichtert selektiert werden kann. Gerade in der Maus erfolgt die vollständige Inaktivierung des Lokus bevorzugt über allele Deletion des verbliebenen Wildtyp-Allels (als sog. Loss-of-Heterozygosity, LOH). Die so auf das Tumorgewebe begrenzte „Null“-Situation kann daher in den meisten Fällen durch einfache allel-spezifische PCR aus genomischer Tumor-DNA nachgewiesen werden. Neben der Beschleunigung der Lymphomentstehung ist LOH des Kandidatenlokus ein weiterer starker Hinweis für die funktionelle Bedeutung eines Gens in der Tumorigenese oder – später – auch in der Therapieantwort. Die Einkreuzung lediglich heterozygoter Läsionen hat darüberhinaus den Vorteil, dass die Akutizität eines LOH-Ereignisses die Mutationsdynamik spontaner Tumorentwicklung rekapituliert. Gerade bei Gen-Familien mit partiell redundanter Funktion, z.B. die p53/p63/p73- oder die Rb/p107/p130-Familien, wäre es vorstellbar, dass ein homozygoter Defekt embryonal kompensiert wird und so keinen Phänotyp zeigt, obwohl der akute Verlust eines dieser Gene funktionell durchaus relevant ist.

Auch retroviral lassen sich genetisch definierte Läsionen im *Em-myc*-System erzeugen: Kandidatengene oder dominant-negative Aktivitäten können durch Infektion mittels entsprechender retroviraler Konstrukte stabil und effizient in isolierte und kurzzeit-kultivierte Lymphomzellen eingebracht werden. Als Derivat des ekotropen MMLV (mouse moloney leukemia virus)-Retrovirus wurde durch wiederholte Zellpassage und weitere Modifikationen das murine MSCV (murine stem cell virus) Retrovirus gewonnen, welches (im Gegensatz zur MMLV) auch in murinen B-Zellen und hämatopoietischen Stammzellen über Monate exprimiert wird. In den hier vorgestellten Arbeiten wurde grundsätzlich eine bizistronische MSCV-Vektorkassette verwendet, bei der Kandidaten-cDNAs vor die „internal ribosomal entry site“ (IRES) kloniert werden können, woraufhin die eGFP-cDNA für grün fluoreszierendes Protein als zweite kodierende Sequenz folgt. Daher exprimieren nach retroviraler Infektion prinzipiell alle GFP-positiven Zellen auch das Kandidatengen. Die GFP-Koexpression dient somit nicht nur zur Abschätzung der Infektionseffizienz, sondern kann auch für einfache Durchfluß-Zellsortung und zur Zellüberwachung *in vivo* eingesetzt werden. Das Infektionsprotokoll erlaubt, binnen maximal vier Tagen frisch isolierte Lymphomzellen hochtitrig mit nicht-replizierenden Retroviren mit guter Infektionseffizienz (d.h. > 70%) stabil zu transduzieren. „Leervektor-“ bzw. MSCV-IRES-GFP-infizierte Zellen exprimieren GFP, wobei infizierte Zellen nach Transplantation in Empfänger-mäusen zu GFP-positiven Lymphomen und Leukämien führen, die ihrerseits fluoreszenzmikroskopisch im Ausstrich oder durchflußzytometrisch nach erneuter Lymphomzell-Isolation erfaßt werden können. Im Gegensatz zu genetischen Läsionen, die über Verpaarung genetisch veränderter Mäuse eingeschleust wurden, erlauben retrovirale Infektionen mit Kontroll- und Kandidatengen-Vektoren identischer Aliquots desselben Ausgangslymphoms die Erzeugung von Lymphom-Populationen, die beide GFP-positiv sind, sich ansonsten aber nur im Status des Testgens unterscheiden. Somit können Serien derartiger Paare aus primären Lymphomen erzeugt und deren biologisches Verhalten in Abhängigkeit des Testgens untersucht werden, ohne dass etwaige Begleitmutationen bekannt sein müssen.

2.2 *p53*- und *INK4a/ARF*-Mutationen akzelerieren die Lymphomgenese und tragen zu Chemoresistenz bei

- Clemens A. Schmitt, Mila E. McCurrach, Elisa de Stanchina, Rachel R. Wallace-Brodeur, Scott W. Lowe (1999). *INK4a/ARF* mutations accelerate lymphomagenesis

and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes & Development* 13: 2670-7. [154]

Durch Verpaarung *Eμ-myc*-transgener mit *p53*^{+/-} Mäusen werden in der F1-Generation unter anderem *myc*-transgene Nachkommen erzeugt, die entweder für *p53* heterozygot sind oder aber keinen definierten Defekt in diesem Locus aufweisen. Beide Genotypen entwickeln *myc*-abhängig Lymphome, jedoch mit unterschiedlicher Latenz. Während nach 70 Tagen Kontroll-Lymphome – das sind *myc*-Lymphome ohne definierte genetische Läsion – in weniger als 25% der Tiere nachweisbar waren, fand sich in der *p53*^{+/-} Gruppe zu diesem Zeitpunkt kein einziges lymphom-freies Tier mehr. Entsprechend wiesen die in *p53*^{+/-} Mäusen entstehenden Lymphome in nahezu allen Fällen eine allele Deletion des verbliebenen Wildtyp-Allels auf, sind also *de facto p53*null.

In ähnlicher Weise führte auch die Einkreuzung eines heterozygoten *INK4a/ARF*-Defekts – präzise der Deletion von Exon 2 und eines Teils von Exon 3, wodurch beide Genprodukte, ARF und p16^{INK4a}, von diesem Allel nicht mehr exprimiert werden können – zur einer dramatischen Lymphom-Akzeleration, deren Ausmaß dem zuvor beschriebenen Effekt bei *p53*-Inaktivierung gleich kommt. Auch im Falle des *INK4a/ARF*-Lokus wurde in den meisten Lymphomen ein LOH des Wildtyp-Allels nachgewiesen, so dass diese Tumoren „Null“-Mutanten beider *INK4a/ARF*-Genprodukte darstellen. Um einzugrenzen, ob *ARF*- oder aber *INK4a*-Gene das primäre Selektionsziel des *INK4a/ARF*-LOH darstellen, wurden auch *Rb*-Knockout- mit *myc*-transgenen Mäusen verpaart. Zum Zeitpunkt dieser Studie war eine „pure“ *INK4a*-Knockout-Maus noch nicht verfügbar; entsprechend fungierte der *Rb*-Defekt als Surrogat für einen alleinigen *INK4a*-Defekt. Die Lymphome, die im *myc x Rb*^{+/-} Hintergrund erzeugt wurden, traten nur geringfügig beschleunigt auf und blieben für den *Rb*-Lokus stets heterozygot, so dass hier ARF als Vermittler im onkogenen Signalweg von Myc zu p53 mutmaßlich die entscheidende tumorsuppressive Rolle zukommt. Entsprechend wurde in Lymphomen aus doppelt-heterozygotem Hintergrund, d.h. *INK4a/ARF*^{+/-}; *p53*^{+/-}, nur das verbliebene *p53*-Allel, aber nie beide Allele im Sinne einer zusätzlichen Selektion gegen die *INK4a*-Komponente inaktiviert. Nicht nur basale, sondern auch mittels *in vivo*-Zytostatika-Therapie induzierte *p53*-Proteinlevel wurden in *INK4a/ARF*null-Lymphomen im Vergleich zu Kontroll-Lymphomen deutlich reduziert gemessen, wobei neben der reduzierten Proteinlevel auch eine eingeschränkte Aktivierbarkeit beispielsweise des *p53*-Targetgens *p21* auffiel. Auch die regelrechte Phänokopie der Tumor-Inzidenzkurven stützt die Hypothese, dass *p53*-vermittelte Failsafe-Mechanismen direkt von ARF-medierte onkogenen Stimuli abhängen.

*p53*null- und *INK4a/ARF*null-Lymphome wachsen gleichermaßen disseminierter und aggressiver als Kontroll-Lymphome, in dem sie insbesondere in viszerale Organe außerhalb des lymphatischen Kompartments infiltrieren. Dabei proliferieren alle drei Genotypen mit vergleichbarer mitotischer Aktivität; und nur *p53*-defiziente Lymphome zeigen offenkundig Aneuploidie. Allerdings konnte sowohl in *p53*null- als auch in *INK4a/ARF*null-Lymphomen kompromittierte Spontan-Apoptosefähigkeit als entscheidender gemeinsamer Defekt identifiziert werden. Interessanterweise zeigten unter Therapie, d.h. nach Cyclophosphamid-Applikation *in vivo*, nicht nur *p53*null-, sondern auch *INK4a/ARF*null-Lymphome einen reduzierten Therapie-Effekt: in Lymphom-Gewebsschnitten vier Stunden nach Zytostatikagabe war kaum Apoptose nachweisbar, während Kontroll-Lymphome hier in der TUNEL-Reaktion, einem Nachweis apoptose-relevanter DNA-Doppelstrangbrüche, massiv positiv reagierten. Über derartige Akut-Effekte hinaus demonstrierten Mäuse mit *p53*null-Lymphomen auch in der Langzeitbeobachtung einen dramatischen Chemosensitivitäts-Defekt; nach etwa 40 Tagen waren nur noch etwa 20% der Tiere in Remission. *INK4a/ARF*null-Lymphom-tragende Mäuse erreichten etwas längere Remissionszeiten, zeigten jedoch ebenfalls ein signifikant schlechteres tumorfreies Überleben im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

2.3 Apoptosedefekte kompromittieren die Chemosensitivität von Tumoren *in vivo*

- Clemens A. Schmitt, Christine T. Rosenthal, Scott W. Lowe (2000). Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nature Medicine* 6: 1029-35. [155]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2001). Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary Eμ-myc lymphomas *in vivo*. *Blood, Cells, Molecules, and Diseases* 27: 206-16. [156]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2001). Programmed cell death is critical for drug response *in vivo*. *Drug Resistance Updates* 4: 132-4. [157]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2002). Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *Journal of Molecular Medicine* 80: 137-46. [158]

Um die Rolle eines strikt anti-apoptotisch wirksamen Kandidatengens auf die Chemosensitivität von *myc*-Lymphomen zu untersuchen, wurden identische Aliquots frisch isolierter Kontroll-Lymphome einerseits mit einem „GFP-only“-Vektor und andererseits mit einem MSCV-bcl2-IRES-GFP-Konstrukt retroviral transduziert, so dass Paare derselben Ausgangslymphome erzeugt wurden, die sich nur in der genomischen Integration von transgenem *bcl2* unterschieden (sog. „matched pairs“). Die erfolgreiche Infektion wurde durchflußzytometrisch und mittels Westernblot nachgewiesen. Darüberhinaus wurde in Zellkultur demonstriert, dass Bcl2-Überexpression – erwartungsgemäß – den „Steady-State“-Anteil lebender Zellen erhöht sowie die Fraktion in Apoptose befindlicher Zellen reduziert, aber keinen Einfluß auf die Proliferationsrate hat. In Kurzzeit-Zytotoxizitätsassays waren Bcl2-überexprimierende Lymphome gegenüber verschiedenen Zytostatika deutlich chemoresistenter als ihre leervektor-transduzierten Pendanten. Interessanterweise nahm dieser Unterschied allerdings bereits durch eine vierwöchige Kultur-Adaptation der Lymphom-Populationen erheblich ab, was sich durch eine zunehmende Resistenzgewinnung insbesondere der zuvor sehr sensitiven Kontroll-Gruppe erklärte. In klonogenen Überlebensassays nach Zytostatika-Präinkubation fand sich hingegen kein Überlebensvorteil für die Bcl2-überexprimierende Gruppe. Erst nach Zugabe von Interleukin-7 (IL-7), einem B-Zell-stimulierenden Zytokin, das natürlicherweise im Lymphknoten-Milieu angeboten wird, konnte ein tendenzieller Vorteil der Bcl2-Gruppe festgestellt werden. Die ausgesprochen schlechte Plattierungseffizienz primärer Lymphomzellen bei der für diesen Test erforderlichen sehr niedrigen Zelldichte in semi-solidem Medium ließ sich dabei sowohl durch IL-7-Zugabe, als auch mittels vorausgegangener Kultur-Adaptation der Zellen verbessern, wobei insbesondere Kontroll-Lymphomzellen profitierten. Die Sequenzierung manifester Kolonien am Ende der Beobachtungszeit hinsichtlich des *p53*-Status zeigte, dass Kontroll-Lymphome in der Mehrzahl der Fälle *p53*-Mutationen akquiriert hatten, also faktisch in vielen Fällen die Langzeit-Chemosensitivität von Bcl2-überexprimierenden mit der von *p53*-defekten Tumorzellen verglichen wurde. Während die Effekte nach Supplementierung von IL-7 verdeutlichen, dass die lokale Tumorumgebung Einfluß auf die Therapieantwort hat und diese Faktoren „*in petri*“ ungewürdigt bleiben, gilt generell für klonogene Überlebensassays, dass die initial notwendige niedrige Ausgangszelldichte und die artefiziellen Kulturbedingungen Konditionen schaffen, wie sie in keiner sich entwickelnden Tumorerkrankung *in vivo* vorkommen. Konsequenterweise wird daher in Kultur für Mutationen selektiert, die Wachstum unter diesen Bedingungen ermöglichen und Resistenz gegenüber Chemotherapie *in vitro* vermitteln. Darüberhinaus versagen die Assays in der Diskriminierung von Zelltod gegenüber Langzeit-Arrest, da nur sich aktiv teilende, d.h. „klonogene“ Zellinseln gemessen werden. Somit stellen die erhobenen Daten die Validität klonogener Überlebensassays für die Beurteilung von Langzeiteffekten nach Chemotherapie, insbesondere der Vorhersage von Therapieantworten der korrespondierenden Tumoren in ihrem natürlichen Habitat *in vivo* in Frage.

Wurden jedoch dieselben Lymphomzellen – als Primärlymphom in der ursprünglichen *myc*-transgenen Maus, als nicht-transduziertes, aber transplantiertes Lymphom, als leervektor-transduziertes und transplantiertes Lymphom oder schließlich als transplantiertes, Bcl2-überexprimierendes Lymphom – *in situ* miteinander verglichen, unterschieden sich die drei erstgenannten Gruppen in ihren Wachstumscharakteristika und insbesondere ihrer spontanen Apoptoseneigung nicht, so dass sich kein Anhalt für eine Beeinflussung der Tumorbilogie durch entweder Transplantation oder Transduktion *per se* ergab, während Bcl2-überexprimierende Lymphome nahezu keine Spontanapoptose zeigten und – interessanterweise – zu deutlich ausgeprägterer Invasion nicht-lymphatischer Organe neigten. Auch wenige Stunden nach systemischer Cyclophosphamid-Applikation verhielten sich nicht-transduzierte und leervektor-infizierte Kontroll-Lymphome im Sinne massiver Apoptose gleich, wohingegen in der Bcl2-Gruppe selbst nach Behandlung kaum apoptotische Zellen zum Nachweis kamen. Mischpopulationen aus Bcl2-überexprimierenden und nicht-transduzierten Zellen desselben Ausgangslymphoms selektierten dabei unter Behandlung für eine deutliche Zunahme der GFP-positiven, d.h. *bcl2*-transduzierten Population. Obwohl in klonogenen Überlebensassays unerkannt, führte Bcl2-Überexpression auch in der Post-Therapie-Langzeitbeobachtung einer Mauskolonie mit entsprechend retroviral infizierten Lymphomen nachhaltig zu Chemoresistenz: nach weniger als 25 Tagen war keine Maus der Bcl2-Gruppe mehr tumorfrei, während in der Kontroll-Gruppe, ähnlich wie bei nicht-transduzierten Kontroll-Lymphomen [154], Langzeit-Remissionen von über 60% beobachtet wurden. Im direkten Vergleich von 15 individuellen „matched pairs“ fand sich stets eine mindestens gleichermaßen kurze, wenn nicht deutlich reduzierte Remissionszeit für das Bcl2-überexprimierende Lymphom gegenüber dem leervektor-transduzierten Aliquot desselben Ausgangslymphoms.

2.4 Apoptose ist die einzige p53-Effektorfunktion zur Suppression *myc*-initiiertter Lymphome

- Clemens A. Schmitt, Jordan S. Fridman, Meng Yang, Eugene Baranov, Robert M. Hoffman, Scott W. Lowe (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1:289-98. [159]

p53 ist das am häufigsten mutiert vorgefundene Tumorsuppressorgen in humanen Tumorentitäten. Da *p53* eine Vielzahl zellulärer Effektorfunktionen – unter anderem Apoptose, Zellzyklus-Checkpoints, Arrest, Seneszenz und genomische Integrität – kontrolliert, bleibt in *p53*-defekten Tumoren unklar, welche dieser Funktionen anti-onkogenen Failsafe-Mechanismen entsprechen und daher Ziel kompromittierender Mutationen sind, und welche Funktionen lediglich als „Nebenprodukt“ der *p53*-Inaktivierung verloren werden, ohne eigentlich zum malignen Phänotyp beizutragen. Untersuchung von *p53*-mutiertem Tumormaterial kann diese Frage problem-immanent nicht klären, und die Suche nach relevanten *p53*-Tumorsuppressorfunktionen in Tumormaterialien mit Defekten spezifischer Effektorfunktionen hat allenfalls korrelativen Charakter. Es wurden daher in einem auf Einzelzellebene kompetitiven *in vivo*-Ansatz *Emyc*-transgene hämatopoietische Stammzellen mit heterozygotem *p53*-Status mit anti-apoptotischen Aktivitäten konfrontiert, d.h. retroviral transduziert. Diese Aktivitäten – *bcl2* und eine dominant-negative Caspase 9 (*C9DN*) – wurden zuvor in Kurzzeit-Zytotoxizitätsassays und in einer Lymphom-Expansionsstudie *in vivo* nach retroviralem Transfer in Kontroll- und *p53*null-Lymphome getestet. Hierbei reduzierten beide Aktivitäten sowohl spontane als auch therapie-induzierte Apoptose erheblich, wohingegen dieser Effekt in den ohnehin therapie-insensitiven *p53*null-Lymphomen nahezu fehlte. Auf etwa 10% GFP-positive Zellen eingestellte Mischpopulationen (analog zur oben beschriebenen Arbeit [155]) von Kontroll-Lymphomen, nicht aber von *p53*null-Lymphomen, reicherten während der Tumorexpansion in Empfängermausen zuverlässig

für die anti-apoptotischen Aktivitäten an. Im Einvernehmen mit Bcl2 als auch partial p53-unabhängiger anti-apoptotischer Aktivität erreichten im *p53*null-Kontext lediglich *bcl2*-transduzierte Zellen einen mäßigen Selektionsvorteil.

Die retrovirale Transduktion von hämatopoietischen Stammzellen aus *myc*-transgenen, fetalen Lebern erlaubt nun die Einschleusung von Genen vor der eigentlichen Lymphomgenese, so dass in letal bestrahlten, stammzell-rekonstituierten Empfänger-mäusen Lymphome dann in Abhängigkeit dieser Läsionen entstehen, wenn sie zugleich GFP exprimieren. *Myc*-Lymphome, die sich im *p53*+/- Kontext entwickelt haben, sind, wie oben berichtet, nahezu ausnahmslos durch LOH des Tumors *p53*-defizient [154]. Durch Transfer anti-apoptotischer Aktivitäten in *p53*+/- hämatopoietische Stammzellen kann nun getestet werden, ob *bcl2* oder *C9DN* effektiv vor Verlust des *p53*-Wildtypallels schützen, da die retroviral eingebrachten Aktivitäten exprimiert werden, bevor das erst in der B-Zell-Entwicklung angeschaltete (*Eμ*)-*myc*-Transgen gegen *p53* selektieren kann. Im Gegensatz zu Lymphomen, die aus Leervektor-transduzierten *myc*-transgenen *p53*+/+ Stammzellen mit erwartet verzögerter Inzidenz hervorgehen, entwickeln sich alle aus *p53*+/- Stammzellen hervorgehenden Lymphome konstrukt-unabhängig gleichermaßen dramatisch rasch. Während hier Leervektor-Kontrollen nur sporadisch und *bcl2*-Infektanten immer GFP-positiv sind, exprimiert nur ein Teil der aus *C9DN*-transduzierten Fetalleberzellen hervorgegangenen Lymphome trotz identischer Onset-Kurven GFP. Die *C9DN*-Lymphome, die GFP-positiv sind, zeigen jedoch ebenso wie die Bcl2-abhängig entstandenen Lymphome keinen Verlust des verbliebenen *p53*-Wildtyp-Allels, während die GFP-negativen und damit nicht *C9DN*-exprimierenden Lymphome genauso wie Leervektor-Kontrollen stets *p53* homozygot inaktivieren. Blockade p53-mediierter Apoptose ist daher hinreichend, um im Kontext *myc*-initiiert Onkogenese vor Selektion gegen *p53* zu schützen.

Histologie und Fluoreszenz-Aufnahmen lebender Mäuse mit GFP-markierten Tumoren dokumentieren, dass Kontroll-Lymphome prinzipiell die Grenzen des lymphohämatopoietischen Systems respektieren. Ein Apoptosedefekt, ob durch *p53*-Verlust oder aber durch Expression einer anti-apoptotischen Aktivität in *p53*-profizienten Zellen, ist dabei hinreichend, um Lymphomzellen aggressiv im Sinne einer destruierenden Invasion in nicht-lymphatische Kompartimente (wie beispielsweise dem Lungenparenchym) oder disseminiert im Sinne einer diffusen Tumoraussaat expandieren zu lassen. In der Tat ließ sich in *bcl2*- oder *C9DN*-transduzierten *p53*+/- Lymphomzellen kompromittierte Apoptose als der einzige p53-Effektordefekt sichern: Lymphome mit heterozygotem *p53*-Status infolge *bcl2*- oder *C9DN*-Einschleusung in die entsprechenden Stammzellen konservieren einen intakten DNA-Schaden-sensiblen G1- und G2- sowie Spindel-Kontrollpunkt und induzieren p21 erwartungsgemäß infolge Bestrahlung. Ebenfalls im Gegensatz zu *p53*-defizienten Lymphomen bleiben sie zumeist pseudo-diploid und behalten reguläre Chromosomenzahlen. Damit ist Apoptose die einzige p53-Effektorfunktion, gegen die im Zuge *myc*-getriebener Lymphomgenese selektiert wird und die daher natürlicherweise Tumorentstehung supprimiert. Demgegenüber werden Defekte in Zellzyklus-Kontrollpunkten oder Aneuploidie häufig in *p53*-defizienten Tumoren vorgefunden, tragen aber zum malignen Phänotyp nicht bei.

2.5 Seneszenz ist ein prognostisch relevantes p53- und p16^{INK4a}-kontrolliertes Therapie-Erfolgsprogramm

- Clemens A. Schmitt, Jordan S. Fridman, Meng Yang, Soyoung Lee, Eugene Baranov, Robert M. Hoffman, Scott W. Lowe (2002). A senescence program controlled by p53 and p16^{INK4a} contributes to the outcome of cancer therapy. Cell 109: 335-346. [160]

Vorarbeiten mit *p53*null- gegenüber Bcl2-überexprimierenden Lymphomen haben gezeigt, dass ungeachtet minimaler Langzeitremissionsraten in beiden Gruppen das

initiale Ansprechen auf Cyclophosphamid (CTX) sehr unterschiedlich ist [154, 155]. Während in der Tumorigenese *myc*-initiierte Lymphome Apoptose als die einzige tumorsuppressive p53-Effektorfunktion identifiziert werden konnte und Bcl2-überexprimierende Lymphome daher trotz intaktem p53 die Aggressivität von *p53*null-Lymphomen phänotypisch kopieren können [159], stellte sich nun die Frage, inwieweit Apoptose gleichsam die entscheidende oder gar alleinig relevante p53-Funktion im Kontext DNA-schädigender Therapie sein würde.

Dynamische Ganzkörper-Fluoreszenz-Aufnahmen lebender Mäuse mit GFP-markierten Lymphomen der genannten Genotypen veranschaulichten, dass leervektor-infizierte Kontroll-Lymphome nach Therapie rasch und dauerhaft in Remission gehen, während dies für *p53*null-Lymphome nur verzögert der Fall ist und es frühzeitig zum Relapse kommt. Dagegen sprechen Bcl2-überexprimierende Lymphome initial gar nicht an, behalten dann aber über längere Zeit eine relativ konstante Tumorblastenlast. Auch die Überlebenskurven im Kaplan-Meier-Format spiegeln dies wieder: sowohl die strikt anti-apoptotische Bcl2-Läsion, als auch *p53*-Verlust verhindern lang-anhaltende Remissionen. Allerdings leben Mäuse mit Bcl2-überexprimierenden Kontroll-Tumoren nach CTX-Therapie trotz fehlender Remissionen wesentlich länger als Mäuse mit *p53*null-Lymphomen, wobei die erstgenannte Gruppe das hervorragende Gesamtüberleben der Kontroll-MSCV-Gruppe nicht erreicht. Das Initialansprechen auf CTX reflektiert also nicht zwangsläufig den Langzeit-Verlauf, wobei das diesbezüglich unterschiedliche Verhalten von Bcl2-überexprimierenden gegenüber *p53*-defizienten Lymphomen auf eine therapie-relevante, nicht-apoptotische p53-Funktion hinweist. Diese Funktion verlängert – zusätzlich zu therapie-induzierter p53-abhängiger Apoptose – das Langzeitüberleben unter Chemotherapie.

Um nicht-apoptotische Therapie-Effekte überhaupt messen zu können, wurden *myc*-transgene Lymphome aus *bcl2*-transduzierten hämatopoietischen Stammzellen generiert. Diese Lymphome weisen, wie gezeigt [159], keinen Selektionsdruck gegen die *p53*-Achse auf und sind darüberhinaus vor zytostatika-induzierter Apoptose geschützt [155]. Paare dieser Lymphome transplantiert in Empfängermäuse können nun direkt miteinander verglichen werden – einmal als unbehandeltes, einmal als behandeltes Lymphom sieben Tage nach CTX-Applikation. Tatsächlich induziert CTX ein komplettes Sistieren der Teilungsaktivität und anhaltend hohe p53-Proteinlevel. *p53*null-Lymphome, unabhängig von ihrem Bcl2-Status, zeigen dagegen keinen zytostatika-medierten Arrest, sondern proliferieren unter CTX. Werden *p53*^{+/-};*bcl2*-Lymphome [159] wiederholt mit CTX behandelt, so wird nun gegen das *p53*-Wildtyp-Allel *in vivo* selektiert. p53 kontrolliert daher ein CTX-induzierbares Langzeit-Arrest-Programm.

Wie in Vorarbeiten berichtet, beschleunigen *INK4a*/*ARF*null-Defekte *myc*-initiierte Lymphomgenese in vergleichbarem Ausmaß wie p53-Inaktivierung [154]. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für Lymphome, die lediglich auf dem Boden eines heterozygoten *ARF*-Defekts entstehen, bei denen also die *INK4a*-Komponente dieses komplexen Locus intakt ist. Alle so erzeugten Lymphome exprimieren kein ARF-Protein mehr und sind daher „*ARF*null“. Während ein Teil der Lymphome hierzu im *INK4a*/*ARF*-Locus *ARF*-exklusive Gensequenzen deletiert, finden sich in anderen *ARF*null-Lymphomen Deletionen, die auch die *INK4a*-Sequenz betreffen und daher simultan zu einer Heterozygotie für *INK4a* führen. Überraschenderweise zeigte sich, dass *ARF*null-Lymphome nicht etwa wie *INK4a*/*ARF*null-Lymphome sehr schlecht, sondern ähnlich gut wie Kontroll-Lymphome auf Behandlung ansprechen. Auch hinsichtlich des Überlebens nach CTX-Therapie verhalten sich *ARF*null-Lymphome viel besser als *INK4a*/*ARF*null-Lymphome, während Bcl2-Überexpression die Verläufe beider Gruppen drastisch verkürzt. Das *INK4a*-Gen kontrolliert daher, unabhängig von der anti-apoptotischen Bcl2-Funktion, eine weitere Komponente der Chemosensitivität.

Kontroll-Lymphome, die bereits vor Therapie – wie viele humane Tumoren auch – homozygote Spontandeletionen im *INK4a/ARF*-Lokus aufweisen und daher weder ARF noch p16^{INK4a} exprimieren, sprechen genauso schlecht auf CTX an, wie dies in der *INK4a/ARF*null-Gruppe beobachtet wurde. Interessanterweise gilt dies ebenso für die ARFnull-Subgruppe, die einen heterozygoten *INK4a*-Defekt akquiriert hatte. In Rezidiv-Tumoren dieser letztgenannten Gruppe kann in den meisten Fällen kein intaktes *INK4a*-Gen mehr nachgewiesen werden; das zunächst verbliebene *INK4a*-Allel wird also unter Therapie deletiert. Wie im Falle von *p53*+/- Progenitorzellen [159] vermag *bc1/2*-Gentransfer auch bei *INK4a/ARF*+/- Stammzellen vor Verlust des Wildtyp-Allels in den entstehenden Lymphomen zu schützen, doch werden auch diese Lymphome unter CTX zu Null-Mutanten. Noch spezifischer kann mittels Einschleusung von p16^{INK4a}-Antisense-Konstrukten in ARFnull-Lymphome demonstriert werden, dass CTX-Therapie gegen die *INK4a*-Komponente des *INK4a/ARF*-Lokus *in vivo* selektiert.

Nicht nur p53, sondern auch p16^{INK4a}-Protein wird Tage nach Chemotherapie in apoptosedefekten Lymphomen hochreguliert vorgefunden, wobei *p53*-defiziente Lymphome offenbar enorm hohe p16^{INK4a}-Level tolerieren. ARFnull-Lymphome exprimieren von intaktem *INK4a* weiterhin p16^{INK4a}, wenn nicht durch wiederholte Behandlungszyklen gegen *INK4a*-Gene selektiert wurde. Werden ARF- oder p16^{INK4a}-cDNAs in *p53*null- oder *INK4a/ARF*null-Lymphomzellen *in vitro* überexprimiert, so akzeptieren *p53*-defiziente Lymphome erwartungsgemäß eine Überexpression des p53-Upstream-Regulators ARF, aber tolerieren auch in diesem Testsystem hohe p16^{INK4a}-Level. Umgekehrt wird in *INK4a/ARF*null-Lymphomen nicht nur gegen das primär tumorsuppressive ARF-Produkt, sondern auch gegen p16^{INK4a} selektiert – analog zu der Selektion gegen *INK4a*-Gene nach zytostatika-vermittelter p16^{INK4a}-Induktion. Die therapie-induzierte Selektion richtet sich dabei entweder gegen *p53*- oder *INK4a*-Gene, aber nicht – wie es im Falle zweier autonomer Signalwege zu erwarten wäre – simultan gegen beide Aktivitäten im selben Lymphom. *INK4a/ARF*null-Lymphome zeigten nach *in vivo*-Therapie in keinem Fall *p53*-Mutationen, noch fand sich in *p53*null;*INK4a/ARF*+/- Lymphomen ein LOH der verbliebenen *INK4a/ARF*-Komponente nach wiederholten CTX-Gaben.

Der Proliferationsstopp nach CTX-Behandlung erfüllt formal Kriterien zellulärer Seneszenz: insbesondere exprimieren die apoptosedefekten Lymphome Tage nach CTX-Gabe in saurem pH massiv β -Galaktosidase (die sogenannte seneszenz-assoziierte „SA- β -Gal“-Aktivität), während unbehandelte Proben derselben Kontroll-Lymphome für diese Reaktion negativ bleiben. *p53*null-Lymphome, die unter CTX nicht arretierten, sind konsequenterweise auch hier SA- β -Gal-negativ. Interessanterweise fehlt *INK4a/ARF*null-Lymphomen die Fähigkeit zum SA- β -Gal-positiven Zellzyklus-Arrest, während (p16^{INK4a}-exprimierende) ARFnull-Lymphome Tage nach CTX-Gabe SA- β -Gal-positiv reagieren. Therapie-induzierte Seneszenz ist daher ein *INK4a*- und *p53*-kontrolliertes Programm, welches zusätzlich zu Apoptose zum Langzeitverlauf nach Zytostatika-Therapie beiträgt.

3 Diskussion und Kritische Wertung

3.1 The Hallmarks of Cancer

Tumorigenese, die onkogene Transformation regelrechter Zellen zu einer autonom und invasiv-destruierend wachsenden Geschwulst, ist ein – je nach Betrachtungsweise – überaus komplexer pathoanatomischer, molekulargenetischer und biochemischer Prozess, der eine Kaskade zellulärer Insulte voraussetzt, um schlußendlich im malignen Phänotyp zu münden. Die zur Tumormanifestation notwendige Zahl und Sequenz der akquirierten Defekte sind dabei nicht nur von der Art der initialen Läsionen, beispielsweise einer genetischen Translokation gegenüber einem chronischen Entzündungsreiz, sondern auch dem Zelltyp – epithelial versus mesenchymal, um nur beispielhaft Klassen zu nennen – und einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängig. Trotzdem gibt es Spielregeln, die über die individuellen Aspekte einzelner Tumorentitäten hinaus von grundsätzlicher Bedeutung für die Tumorentstehung sind. In ihrer seminalen Übersichtsarbeit haben Hanahan und Weinberg die Insensitivität gegenüber apoptotischem Zelltod, ein unbegrenztes Zellteilungs-Potential, die Autonomie der Wachstumsstimulation, die Entkopplung von externer Wachstumskontrolle und eine hinreichende Gefäßversorgung als die fundamentalen Grundqualitäten des malignen Phänotyps, der „Hallmarks of Cancer“, zusammengefaßt und deren molekularen Zusammenhänge in einer „Netzwerk-Karte“ visualisiert [161, 162]. Während die meisten Tumorentitäten auf diesen Säulen aufbauen, so kann deren Reihenfolge und Zeitpunkt sowie deren spezifischer Beitrag auf den „Malignisierungsprozess“ individuell sehr verschieden sein. Da sich jedoch die meisten der genannten Qualitäten in fortgeschrittenen Erkrankungen finden, hat sich aus der „Hallmark-Doktrin“ die weit verbreitete implizite Vorstellung abgeleitet, es handele sich dabei um notwendige Defekte für die Tumorentstehung, die darüberhinaus auch für den Tumorerhalt essentiell sein könnten.

3.2 The Lifelines of Cancer

Die typischerweise im Laufe der Tumorigenese erworbenen Defekte und Fähigkeiten (die sogenannten „Cancer acquired Capabilities“) setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: der modifizierten Interaktion mit der Tumorumgebung einerseits und der Abschaltung zell-autonomer Kontrollmechanismen andererseits. Während die Entkopplung vom umgebenden Milieu durch Produktion eigener Wachstumsfaktoren, Desensibilisierung gegenüber inhibitorischen Signalen und Stoffwechseladaptation an eine insuffiziente Ver- und Entsorgungslage Qualitäten sind, die autonomes Wachstum erleichtern, so ist die Inaktivierung intrinsischer zellulärer Kontroll-Programme, d.h. der Failsafe-Programme Apoptose oder Seneszenz, ultimativ notwendig, um die Manifestation eines malignen Klons zuzulassen (daher sogenannte „Cancer required Capabilities“). Inwieweit dabei aktivierte Onkogene für Defekte in Failsafe-Mechanismen selektieren, kann von den Milieu-Bedingungen beeinflusst werden. Überlebensfördernde Wachstumsfaktoren beispielsweise mögen dazu beitragen, dass bereits weniger deletäre Apoptosedefekte zur Initiation klonalen Wachstums ausreichen. Umgekehrt können besonders wachstumshemmende Umgebungsbedingungen wie unzureichende Gefäßversorgung und daraus resultierende Hypoxie trotz manifester Failsafe-Defekte zusätzliche Mutationen mit noch stärkerem Phänotyp provozieren. Dabei moduliert das Milieu die Mutationsempfänglichkeit des Tumors; die vitalen, tumorigenen Defekte liegen jedoch in der Inaktivierung tumor-autonomer Failsafe-Mechanismen und konstituieren damit die „Lifelines of Cancer“.

Es ist mittlerweile klar, dass Failsafe-Programme nicht nur eine wichtige Barriere gegenüber potentieller Tumormanifestation darstellen, sondern aufgrund ihrer Beteiligung an Zytostatika-Effektormechanismen zum Erfolg von DNA-schädigender Tumorthapie

beitragen (vgl. 1.4). Hierdurch entsteht ein formal logisches Dilemma medikamentöser antineoplastischer Behandlung: Tumoren, die notwendigerweise auf Defekten in Failsafe-Programmen beruhen, werden mit Substanzen behandelt, deren Wirksamkeit von der Intaktheit eben dieser Programme abhängt. Ironischerweise könnten die dann ineffektiven, aber intrinsisch mutagenen DNA-schädigende Pharmaka den malignen Phänotyp sogar noch verschärfen, wenn Failsafe-Mechanismen wie DNA-Reparatur nicht mehr adäquat funktionieren.

Dass konventionelle Chemotherapie dennoch ihren Stellenwert in der Tumorbehandlung hat, erklärt sich aus mehreren Aspekten. Mitogene Onkogene provozieren nicht nur eine zelluläre Gegenreaktion im Sinne der genannten Failsafe-Mechanismen, sondern sensibilisieren die Apoptose-Maschinerie auf verschiedenen Ebenen, beispielsweise durch direkte Aktivierung von Caspasen auch unterhalb von p53 [163, 164], und erklären so die höhere Chemosensitivität neoplastischer Zellen im Vergleich zum Normalgewebe. Außerdem führen die meisten Läsionen in Apoptose-Programmen nicht zu einer kategorischen „Apoptose-Resistenz“, sondern erhöhen durch Verlegung bestimmter Effektor-Pathways im Apoptose-Netzwerk die Schwelle für pro-apoptotische Signale, jenseits der Zelltod exekutiert wird. Dieser Effekt wird klinisch wirkungsvoll durch sogenannte Hochdosis-Therapien ausgenutzt. Darüberhinaus können Zytostatika neben Apoptose mit Seneszenz ein alternatives Failsafe-Programm als weiteren prognose-relevanten Effektormechanismen rekrutieren. Dieser Aspekt ist besonders dort von Bedeutung, wo onkogene Aktivität gegen ein bestimmtes Failsafe-Programm selektiert hat, jedoch ein anderes, therapeutisch nutzbares Programm weiterhin intakt verfügbar ist.

Die zentrale Bedeutung ultimativ zellzyklus-terminierender Programme wie Apoptose und Seneszenz und die demzufolge vitale Abhängigkeit etablierter Tumoren von Defekten in diesen Programmen machen die „Lifelines of Cancer“ sehr viel zwangsläufiger und direkter als die milieu-gesteuerten Prinzipien der „Hallmarks of Cancer“ zu potentiellen Therapiezielen. Tatsächlich haben in präklinischen und frühen klinischen Prüfungen Angiogenese-Inhibitoren oder Hemmstoffe von Matrix-Metalloproteinasen eher enttäuschende Effekte gezeigt. Trotz möglicherweise erheblicher Antiangiogenese oder Reduktion der Gewebsinvasivität hängt der tumorlytische Erfolg derartiger Therapieprinzipien letztendlich von intakten endogenen Eradikationsmechanismen ab, die aber mutationsbedingt häufig nicht mehr verfügbar sind. Die Identifikation expliziter inaktivierender Mutationen in Failsafe-Programmen eröffnet allerdings die Möglichkeit, mittels läsionsspezifischer „kleiner Moleküle“ Apoptose oder Seneszenz im Sinne einer „targeted Therapy“ zu restaurieren und damit die Zellen für klassische Chemotherapie oder andere, indirekte Therapieformen zu re-sensibilisieren.

3.3 Stellenwert prämaturer Seneszenz in Tumorthherapie und Prognose

In eigenen Arbeiten konnte erstmalig akut induzierbare, prämaturre Seneszenz als ein p53- und p16^{INK4a}-kontrolliertes, prognostisch relevantes neues Effektorprogramm unter Chemotherapie identifiziert und die biologischen und klinischen Konsequenzen inaktivierender Mutationen demonstriert werden. p53 und p16^{INK4a} kooperieren als zytostatika-responsive Mediatoren in zunächst parallelen Signalwegen, die als gemeinsame Endstrecke in der Exekution von Seneszenz münden. Die biochemischen und zell-strukturellen Grundlagen des „Senescence Switch“ zu einem teilungsunfähigen, aber metabolisch aktiven Status sind nicht hinreichend bekannt. Es ist vorstellbar, dass p16^{INK4a} und p53 unterschiedliche Funktionen in Initiation und Erhaltung des seneszenten Zustands wahrnehmen. Ob auch ARF – welches in erster Linie onkogen-vermittelt Failsafe-Programme (d.h. *myc*-induzierte Apoptose und *ras*-induzierte Seneszenz) aktiviert – eine Bedeutung für therapie-bedingte Seneszenz hat, ist derzeit unklar.

Offenkundig kann der alleinige Verlust von ARF *myc*-initiierte Tumorigenese dramatisch forcieren, ohne dabei therapie-induzierbare Seneszenz zu kompromittieren.

Therapie-induzierbare Seneszenz ist nach heutigem Wissen biochemisch und morphologisch nicht von anderen Formen der prämaternen Seneszenz zu unterscheiden [20, 43]. Der beschriebene CTX-induzierte SA- β -Gal-positive Zellzyklus-Arrest geht mit der Induktion der gut dokumentierten „Seneszenz-Marker“ p53, p16^{INK4a} und PML einher. Inwieweit prämatern Seneszenz dabei wie die telomer-gesteuerte replikative Seneszenz tatsächlich irreversibel ist, wird in zukünftigen Untersuchungen zu klären sein. Dass, wie in der Originalarbeit gezeigt, apoptose-defiziente (*bcl2*-transduzierte) Lymphome nach langer Latenz wieder progredient werden, mag auf präformierte Mutationen vor Therapie zurückzuführen sein, die nun unter CTX-induzierter Seneszenz selektiert wurden. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass einzelne Tumorzellen, möglicherweise durch lokale Zytostatika-Verteilungsinhomogenitäten, niemals seneszent geworden waren. Ob prämatern Seneszenz formal einen terminalen Ruhezustand darstellt, wird kontrovers diskutiert. Durch akute (Cre-Rekombinase-vermittelte) Inaktivierung des indirekten p16^{INK4a}-Targets Rb kann experimentell Proliferation aus Seneszenz heraus erzwungen werden (T. Jacks, AACR-Präsentation 2002), doch bleibt offen, ob ein derartiger mutagener „Escape“-Mechanismus aktiv in seneszenten Tumorzellen überhaupt stattfinden könnte. Seneszenz als irreversibles therapie-induzierbares Arrest-Programm wäre qualitativ therapie-induzierter Apoptose äquivalent, da beide Programme Tumorzellen endgültig aus dem replikativen Zellzyklus ausschleusen. Möglicherweise wird Seneszenz vor allem sequentiell als „Rückversicherungs-Mechanismus“ rekrutiert, wenn Apoptose bereits kompromittiert ist. Selbst wenn der Aspekt der Irreversibilität prämaturner Seneszenz noch nicht abschließend geklärt ist, so konnten eigene Daten demonstrieren, dass therapie-induzierte Seneszenz neben Apoptose entscheidend zum Therapie-Outcome beiträgt.

3.4 Nebenprodukte werden zur Hauptsache

Die dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden Arbeiten sollen zum Verständnis des komplexen Verhältnisses zwischen Tumorgenese und Tumorthherapie beitragen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass in manifesten Malignomen Failsafe-Programme, d.h. „genetische Abwehrkonzepte“, inaktiviert werden müssen und daher ganze Signalkaskaden potentielle Mutationstargets darstellen. Interessanterweise kreuzen Therapie-Effektorprogramme die Tumorsuppressor-Pathways auf verschiedenen Ebenen, so dass manche Tumorsuppressor-Defekte bereits vor Therapiebeginn Chemoresistenz determinieren. Die Kreuzung des onkogenen und des DNA-Schädigungs-getriggerten Signalwegs auf Höhe des zentralen „Relais“ p53 verschaltet dabei nicht nur Tumorsuppression mit Therapie-Exekution, sondern stellt auch die gemeinsame Kontrollebene von Apoptose und Seneszenz dar. Trotz vieler weiterer p53-gesteuerter Funktionen wird im Kontext von aktiviertem *myc* gegen p53 nur selektiert, um p53-abhängige Apoptose auszuschalten [159]. Als „Nebenprodukt“ wird dabei p53-kontrollierte Seneszenz ko-inaktiviert, obwohl *myc*-initiierte Lymphome keines Seneszenz-Defekts bedürfen [160]; dieser Nebeneffekt wird erst unter Therapie relevant und unterstreicht, dass tumor-etablierende Mutationen bereits vor der ersten Zytostatika-Exposition Chemoresistenz begründen können. Der Verlust von therapie-induzierbarer Apoptose und Seneszenz erklärt den limitierten Therapieerfolg und daher die dramatisch schlechte Prognose p53-defizienter Lymphome. Wird hingegen ARF als onkogener Signalvermittler zu p53 inaktiviert (wodurch – „mutually exclusive“ – Schutz vor p53-Mutationen entsteht), formieren sich Lymphome ebenso rasant, doch bleibt zumindest Seneszenz als Zytostatika-Effektor verfügbar – und der klinische Therapie-Effekt ist entsprechend gut. Erst die konsekutive Abschaltung des Seneszenz-Programms durch *INK4a*-Verlust, wenn

die bereits manifesten Tumoren einem neuartigen zellulären Stress, d.h. DNA-schädigender Chemotherapie, ausgesetzt werden, kompromittiert die Prognose. Selektion gegen die *INK4a*-Komponente unter Chemotherapie ist von humanen hämatologischen Neoplasien bekannt, ohne dass jedoch Seneszenz als der zugrunde liegende Mechanismus identifiziert werden konnte [165, 166, 167]. Auch Apoptose-Inaktivierung durch Bcl2 kooperiert mit *myc*-mediierter Tumorigenese, ohne mit Seneszenz zu interferieren. Folglich haben diese Lymphome eine intermediäre, aber gegenüber *p53*-defizienten Tumoren deutlich bessere Prognose nach Therapie. Dies reflektieren sehr gut klinische Verläufe von Patienten mit Bcl2-überexprimierendem follikulären Lymphom, bei denen typischerweise eine chemotherapeutische Langzeit-Kontrolle des Tumorleidens, aber keine Heilung erzielt werden kann. In Analogie zu Verläufen im präsentierten Mausmodell finden sich in den Tumoren dieser Patienten häufig *p53*- oder *INK4a/ARF*-Mutationen, wenn es schließlich zur terminalen Tumorprogression kommt [168, 169].

3.5 Von Mäusen zu Menschen

Trotz der erläuterten Stärken des hier eingesetzten Mausmodells – allem voran vergleichende chemotherapeutische Studien an Lymphomen mit definierten genetischen Läsionen *in vivo* durchführen zu können, welche in dieser Art an Patienten aus ethischen oder technischen Gründen unmöglich wären – gilt die Interpretation der beobachteten Effekte nicht zwangsläufig über Spezies-Grenzen hinweg. Auch kann ein *myc*-transgenes Lymphommodell bevorzugt karzinom-relevante Signalwege oder Effekte funktionell andersartiger Onkogene (beispielsweise onkogenes *ras*) nicht gleichermaßen widerspiegeln. Dennoch sind nicht nur die generellen „Spielregeln“ der Onkogenese und der dagegen gerichteten tumorsuppressiven Mechanismen in humanen und murinen Systemen offenbar sehr ähnlich, sondern liegen auch hohe Interspezies-Homologien der hier untersuchten Schlüsselgene, d.h. des *p53*- und des *INK4a/ARF*-Lokus, bezüglich Sequenz und genomischer Architektur vor. In vielen humanen Tumorentitäten konnte *p53*-Inaktivierung nicht nur als relevanter Aspekt der Tumorigenese, sondern auch als Therapie-Prognostikator identifiziert werden [118, 120, 170], wobei insbesondere in soliden Tumoren die akkurate Einschätzung des *p53*-Status technisch schwierig ist [171] und die biologische Konsequenz individueller *p53*-Mutationen uneinheitlich ist [56]. Weiterhin gibt es erste Daten, die auf die Existenz von therapie-induzierbarer Seneszenz in humanen epithelialen Tumorzellen *in vitro* [172] und *in vivo* [173] hinweisen. Korrelative Untersuchungen bestätigen zudem die Bedeutung von *p53* und *p16^{INK4a}* als Regulatoren zytostatika-induzierter Seneszenz auch im Humansystem *in vivo* [173]. Auch stellt die Erzeugung heterozygoter Compound-Genotypen durch Knockout-Verpaarung mit nachfolgendem potentiellen „Loss of heterozygosity“ (LOH) eine brauchbare Annäherung an die klassische Zwei-Schritt-Hypothese der genetischen Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen dar [153]. Tatsächlich finden sich in humanen Tumorproben komplexe Inaktivierungsmuster beider *INK4a/ARF*-kodierten Gene durch Deletionen, Punktmutationen oder Promotor-Hypermethylierung, wobei Defekt-Konstellationen analog der im Mausmodell untersuchten *ARF-INK4a*-Inaktivierungssequenz in Patientenmaterial beschrieben sind [65, 174]. Darüberhinaus stellt – wie in murinen *ARF* null-Lymphomen mit alledem *INK4a*-Verlust – *INK4a*-Hemizygotie in humanen hämatologischen Neoplasien einen ungünstigen Prognosefaktor dar [167]. Die *Eμ-myc*-transgene Maus als genetisch gezielt zu manipulierendes und klinisch, histopathologisch und molekularbiologisch gut zu evaluierendes Testsystem liefert daher Daten zu Tumorentstehung und Therapiesensitivität, die offenkundig von hohem Aussagewert für humane Tumorerkrankungen, insbesondere hämatologische Neoplasien, sind.

3.6 „Mining the Genome“: Gene, Proteine und ihre Funktionen

Die mit der Sequenzierung des humanen Genoms eingeleitete „post-genomische“ Ära steht für die enorme wissenschaftliche Herausforderung, die generierte Rohdatenmenge in sinnvolle genetische und ultimativ medizinisch brauchbare Information zu übersetzen. Große Bedeutung haben hier „genom-weite“ Expressionsanalysen mittels Mikroarrays erlangt, auf denen Transkripte gegenüber mehreren zehntausend cDNAs und exprimierten „Sequence-Tags“ in einer einzigen Hybridisierungsreaktion quantifiziert werden können. Die bis *dato* begrenzte Akkuranz der Methodik verlangt jedoch erhebliche Folgearbeiten, um die Reliabilität der relativen Expressionsintensitäten zu überprüfen. Die Identifikation biologisch signifikanter Resultate ist schwierig, basiert häufig auf einer subjektiven Auswahl eingehend zu charakterisierenden Kandidatensequenzen und erfordert oft immensen Post-Array-Klonierungs- und Validierungsaufwand. Eine interessante Alternative liegt in der Nutzung von Mikroarrays zur rein deskriptiven Erstellung molekularer „Fingerabdrücke“ von Tumorentitäten. Durch Cluster-Bildung aus den Expressionsprofilen zahlreicher individueller Tumormproben lassen sich so gegebenenfalls innerhalb einer – nach konventionellen Klassifikationskriterien – einzelnen nosologischen Entität neue Subgruppen identifizieren. Die Stratifizierung nach Expressionssignaturen und deren Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten kann dann helfen, wichtige prognostische bzw. therapie-relevante Unterschiede innerhalb einer vormals einheitlichen Entität aufzudecken, ohne dass hierfür auch nur eine einzige der array-untersuchten cDNA-Sequenzen näher bekannt sein müsste [175, 176] [177, 178, 179]. Die derartige Nutzung von Mikroarrays als kostengünstiges „High-Throughput“-Verfahren wird wahrscheinlich sehr bald zum diagnostischen Standard in der genetischen Charakterisierung von Tumormaterial werden. Auch das *myc*-transgene Mausmodell stellt eine ideale Plattform für phänotyp-gesteuerte „Forward Genetics“-Expressionsuntersuchungen mittels Array-Technik dar, da in einer beliebigen Zahl primärer Lymphomerkrankungen zwei definierte Zustandsformen desselben Ausgangslymphoms – beispielsweise behandelt versus unbehandelt oder chemosensibel versus chemoresistent – miteinander verglichen werden können.

Neben Phänotyp-zu-Gen-Strategien wird es in der post-genomischen Ära zunehmend wichtiger, funktionelle Genomik in aussagefähigen Gen-zu-Phänotyp-Modellen betreiben zu können. Eine besondere Stärke des *Eμ-myc*-transgenen Mausmodells liegt darin, Kandidatengene funktionell im Sinne von „Reverse Genetics“ in einem relevanten Kontext, d.h. exprimiert in spontan entstandenen Tumoren in natürlicher Umgebung zu studieren. Beispielsweise können ganze Serien manipulierter Genaktivitäten retroviral rasch und ökonomisch in hämatopoietische Stammzellen eingeschleust werden, woraufhin sich phänotypische Konsequenzen in den nach Stammzelltransplantation entstehenden Neoplasien unmittelbar untersuchen lassen. Neben der tumorbiologischen und molekulargenetischen Analyse der so erzeugten Lymphome kann im *myc*-transgenen Mausmodell in einzigartiger Weise Pharmakogenomik betrieben werden: basierend auf Tumoren mit definierten genetischen Defekten und möglicherweise bekannter funktioneller Charakteristika können – wie in klinischen Studien – verschiedene Behandlungsarme systematisch *in vivo* getestet werden. Pharmakogenomische Untersuchungen haben in diesem Modell die deletäre Bedeutung von *p53*- oder *INK4a/ARF*-Defekten für das tumorfreie Überleben nach konventioneller Chemotherapie demonstriert und konnten darüberhinaus therapie-induzierbare Seneszenz als prognostisch relevantes Effektorprogramm neben Apoptose identifizieren. Es ist naheliegend, dass die Rückführung kompromittierter Behandlungserfolge auf explizite Mutationen oder Inaktivierungen bestimmter Signalwege die Basis für neuartige biologische Therapieformen liefern wird.

4 Zusammenfassung und Perspektiven

Präklinische und klinische Arbeiten der letzten Jahre machen zunehmend deutlicher, dass Apoptose nicht nur einen zentralen Failsafe-Mechanismus zur Verhinderung maligner Transformation darstellt, sondern tatsächlich einen wichtigen Beitrag zu Therapieerfolg und Prognose in der Folge DNA-schädigender Chemotherapie leistet. Eigene Arbeiten in einem transgenen Lymphommodell mit genetischen, biochemischen und klinischen Parallelen zu humanen Non-Hodgkin-Lymphomen konnten zeigen, dass definierte Defekte in Loci wie *p53* und *INK4a/ARF* oder Bcl2-Überexpression nicht nur zelluläre Failsafe-Mechanismen inaktivieren und so *myc*-initiierte Lymphomgenese beschleunigen, sondern auch therapie-induzierte Apoptose und damit Therapieerfolg *in vivo* kompromittieren. Zellkultur-basierende Testsysteme wie beispielsweise klonogene Assays können diese wichtige Implikation apoptotischer Defekte methoden-bedingt übersehen. Mit der Identifikation von programmiertem Zelltod als prognostisch relevantem Effektormechanismus zytostatischer Tumorthherapie wird Apoptosemodulation bzw. „Reparatur“ von Apoptosedefekten zu einer logischen therapeutischen Option. Es ist jedoch außerordentlich schwierig, geeignete Zielstrukturen zu definieren, da sich Apoptosedefekte auf verschiedensten Ebenen des komplexen Apoptose-Netzwerks manifestieren können. Umgekehrt ist unklar, ob die Einschleusung pro-apoptotischer Aktivitäten, die mögliche „Upstream“-Defekte durch direkte Aktivierung der terminalen Apoptose-Maschinerie kurzschließen, hinreichend tumorselektiv wirken können. Es wird daher wichtig sein, diejenigen Mutationen zu identifizieren, die vital zum Tumorphänotyp beitragen. Konkret kommt hier einer intensiven Charakterisierung aberranter *p53*-Funktionen im Kontext mutierter *p53*-Allele und der Analyse intrinsisch tumor-exklusiver Onkogen-Aktivitäten besondere Bedeutung zu.

Neben Apoptose konnten die Arbeiten im *myc*-transgenen Lymphommodell erstmalig prämaturne Seneszenz, d.h. einen mutmaßlich terminalen Zellzyklus-Arrest, als ein weiteres akut zytostatika-induzierbares Programm identifizieren, welches zum Überleben nach Chemotherapie beiträgt und das von *p53* und *p16^{INK4a}* in noch ungeklärter Weise dauerhaft kontrolliert wird. Die tumorbiologischen Implikationen therapie-induzierbarer Seneszenz bedürfen umfangreicher Folgeuntersuchungen. Neben der bereits diskutierten Frage, inwieweit diese Form von Seneszenz tatsächlich einen irreversiblen Proliferationsstopp darstellt, wird zu klären sein, ob Seneszenz *per se* einen positiven Beitrag zum Gesamtüberleben nach Chemotherapie leistet, oder ob dieser Aspekt erst dann zum Tragen kommt, wenn therapie-induzierte Apoptose versagt hat. Ebenfalls ist das Schicksal seneszenten Zellen *in vivo* völlig unklar: bevor die arretierten, aber metabolisch aktiven Zellen mutmaßlich desintegrieren oder phagozytiert werden, könnten sie als „Feederzellen“ das Wachstum nicht-seneszenten Nachbar-Tumorzellen beeinflussen oder gar als antigen-präsentierende Zellen immunmodulierend wirken. Die Dissektion der komplexen genetischen Kontrolle therapie-induzierbarer Seneszenz wird daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen mittels „Forward-“ und „Reverse Genetics“-Techniken sein. Es ist vorstellbar, dass gegenüber Tumorentitäten, die mit einem hohen anti-apoptotischen Selektionsdruck, aber nur selten mit *p53*-Mutationen einhergehen und die daher typischerweise seneszenz-kompetent bleiben, mittels präferentiell „zytostatisch“ wirkenden Pharmaka eine effektivere Tumorkontrolle erzielt werden könnte. Insbesondere aber sollen neben *p53*- und *INK4a*-Verlusten weitere Gendefekte identifiziert werden, die zur Deregulation therapie-induzierbarer Seneszenz führen. Zukünftige Studien mit läsionsspezifischen „targeted Therapeutics“ – durchzuführen sowohl im *myc*-transgenen Mausmodell als auch in humanem Primärmaterial – werden zu klären haben, inwieweit die gezielte Restaurierung des Seneszenz-Programms durch derartige „small Compounds“ alleine oder als Begleitregime zu klassischer Chemotherapie Zytostatika-Toxizität reduzieren und den Langzeit-Therapieerfolg günstig beeinflussen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] deVita, V. T.; Hellman, S. und Rosenberg, S. A. (2001): Cancer: principles and practice of oncology, 6. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ISBN: 0-7817-2229-2.
- [2] McKelvey, E. M.; Gottlieb, J. A.; Wilson, H. E.; Haut, A.; Talley, R. W.; Stephens, R.; Lane, M.; Gamble, J. F.; Jones, S. E.; Grozea, P. N.; Gutterman, J.; Coltman, C. und Moon, T. E. (1976): Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma, *Cancer* (Band 38), Nr. 4, Seite 1484-93.
- [3] Fisher, R. I.; Gaynor, E. R.; Dahlborg, S.; Oken, M. M.; Grogan, T. M.; Mize, E. M.; Glick, J. H.; Coltman, C. A., Jr. und Miller, T. P. (1993): Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma, *N Engl J Med* (Band 328), Nr. 14, Seite 1002-6.
- [4] Kimby, E.; Brandt, L.; Nygren, P. und Glimelius, B. (2001): A systematic overview of chemotherapy effects in aggressive non-Hodgkin's lymphoma, *Acta Oncol* (Band 40), Nr. 2-3, Seite 198-212.
- [5] Viens, P. und Maraninchi, D. (2002): High-dose chemotherapy in advanced breast cancer, *Crit Rev Oncol Hematol* (Band 41), Nr. 2, Seite 141-9.
- [6] Chen, C. J.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. und Roninson, I. B. (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell* (Band 47), Nr. 3, Seite 381-9.
- [7] Shen, D. W.; Fojo, A.; Chin, J. E.; Roninson, I. B.; Richert, N.; Pastan, I. und Gottesman, M. M. (1986): Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification, *Science* (Band 232), Nr. 4750, Seite 643-5.
- [8] Wuchter, C.; Leonid, K.; Ruppert, V.; Schrappe, M.; Buchner, T.; Schoch, C.; Haferlach, T.; Harbott, J.; Ratei, R.; Dorken, B. und Ludwig, W. D. (2000): Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia, *Haematologica* (Band 85), Nr. 7, Seite 711-21. URL: <http://www.haematologica.it/abstr/wuchter8507.htm>
- [9] Consoli, U.; Santonocito, A.; Stagno, F.; Fiumara, P.; Privitera, A.; Parisi, G.; Giustolisi, G. M.; Pavone, B.; Palumbo, G. A.; Di Raimondo, F.; Milone, G.; Guglielmo, P. und Giustolisi, R. (2002): Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia, *Br J Haematol* (Band 116), Nr. 4, Seite 774-80.
- [10] Strasser, A.; Whittingham, S.; Vaux, D. L.; Bath, M. L.; Adams, J. M.; Cory, S. und Harris, A. W. (1991): Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 19, Seite 8661-5.
- [11] Hakem, R.; Hakem, A.; Duncan, G. S.; Henderson, J. T.; Woo, M.; Soengas, M. S.; Elia, A.; de la Pompa, J. L.; Kagi, D.; Khoo, W.; Potter, J.; Yoshida, R.; Kaufman, S. A.; Lowe, S. W.; Penninger, J. M. und Mak, T. W. (1998): Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo, *Cell* (Band 94), Nr. 3, Seite 339-52.
- [12] Chin, L.; Tam, A.; Pomerantz, J.; Wong, M.; Holash, J.; Bardeesy, N.; Shen, Q.; O'Hagan, R.; Pantginis, J.; Zhou, H.; Horner, J. W., 2nd; Cordon-Cardo, C.; Yancopoulos, G. D. und DePinho, R. A. (1999): Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance, *Nature* (Band 400), Nr. 6743, Seite 468-72.
- [13] Felsher, D. W. und Bishop, J. M. (1999): Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages, *Mol Cell* (Band 4), Nr. 2, Seite 199-207.
- [14] Huettner, C. S.; Zhang, P.; Van Etten, R. A. und Tenen, D. G. (2000): Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1, *Nat Genet* (Band 24), Nr. 1, Seite 57-60. URL: http://library.genetics.nature.com/server-java/Propub/genetics/ng0100_57.fulltext
http://library.genetics.nature.com/server-java/Propub/genetics/ng0100_57.abstract
- [15] Pelengaris, S.; Khan, M. und Evan, G. I. (2002): Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression, *Cell* (Band 109), Nr. 3, Seite 321-34.
- [16] Lowe, S. W.; Ruley, H. E.; Jacks, T. und Housman, D. E. (1993): p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell* (Band 74), Nr. 6, Seite 957-67.

- [17] Fisher, D. E. (1994): Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold, *Cell* (Band 78), Nr. 4, Seite 539-42.
- [18] Lowe, S. W. (1999): Activation of p53 by oncogenes, *Endocr Relat Cancer* (Band 6), Nr. 1, Seite 45-8.
- [19] Sherr, C. J. (2000): The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 14, Seite 3689-95.
- [20] Campisi, J. (2001): Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, *Trends Cell Biol* (Band 11), Nr. 11, Seite S27-31.
- [21] Evan, G. I.; Wyllie, A. H.; Gilbert, C. S.; Littlewood, T. D.; Land, H.; Brooks, M.; Waters, C. M.; Penn, L. Z. und Hancock, D. C. (1992): Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein, *Cell* (Band 69), Nr. 1, Seite 119-28.
- [22] Lowe, S. W.; Jacks, T.; Housman, D. E. und Ruley, H. E. (1994): Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 6, Seite 2026-30.
- [23] Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Beach, D. und Lowe, S. W. (1997): Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell* (Band 88), Nr. 5, Seite 593-602.
- [24] Weinberg, R. A. (1997): The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play, *Cell* (Band 88), Nr. 5, Seite 573-5.
- [25] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, Seite 239-57.
- [26] Sellins, K. S. und Cohen, J. J. (1987): Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes, *J Immunol* (Band 139), Nr. 10, Seite 3199-206.
- [27] Debatin, K. M.; Goldmann, C. K.; Bamford, R.; Waldmann, T. A. und Krammer, P. H. (1990): Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia, *Lancet* (Band 335), Nr. 8688, Seite 497-500.
- [28] Shi, Y.; Glynn, J. M.; Guilbert, L. J.; Cotter, T. G.; Bissonnette, R. P. und Green, D. R. (1992): Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas, *Science* (Band 257), Nr. 5067, Seite 212-4.
- [29] Green, D. R. und Reed, J. C. (1998): Mitochondria and apoptosis, *Science* (Band 281), Nr. 5381, Seite 1309-12.
- [30] Thornberry, N. A. und Lazebnik, Y. (1998): Caspases: enemies within, *Science* (Band 281), Nr. 5381, Seite 1312-6.
- [31] Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L. und Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell* (Band 102), Nr. 1, Seite 33-42.
- [32] Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J. (1998): BCL-2 family: regulators of cell death, *Annu Rev Immunol* (Band 16), Seite 395-419.
- [33] Reed, J. C.; Jurgensmeier, J. M. und Matsuyama, S. (1998): Bcl-2 family proteins and mitochondria [In Process Citation], *Biochim Biophys Acta* (Band 1366), Nr. 1-2, Seite 127-37.
- [34] Borzillo, G. V.; Endo, K. und Tsujimoto, Y. (1992): Bcl-2 confers growth and survival advantage to interleukin 7-dependent early pre-B cells which become factor independent by a multistep process in culture, *Oncogene* (Band 7), Nr. 5, Seite 869-76.
- [35] Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E. und Croce, C. M. (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* (Band 228), Nr. 4706, Seite 1440-3.
- [36] Harrington, E. A.; Bennett, M. R.; Fanidi, A. und Evan, G. I. (1994): c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines, *Embo J* (Band 13), Nr. 14, Seite 3286-95.
- [37] Graeber, T. G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D. E.; Koch, C. J.; Lowe, S. W. und Giaccia, A. J. (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours [see comments], *Nature* (Band 379), Nr. 6560, Seite 88-91.
- [38] Evan, G. und Littlewood, T. (1998): A matter of life and cell death, *Science* (Band 281), Nr.

5381, Seite 1317-22.

- [39] Hayflick, L. und Moorhead, P. S. (1961): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* (Band 25), Seite 585-621.
- [40] Harley, C. B.; Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature* (Band 345), Nr. 6274, Seite 458-60.
- [41] Karlseder, J.; Smogorzewska, A. und de Lange, T. (2002): Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss, *Science* (Band 295), Nr. 5564, Seite 2446-9. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/295/5564/2446>
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/295/5564/2446>
- [42] Blasco, M. A.; Lee, H. W.; Hande, M. P.; Samper, E.; Lansdorp, P. M.; DePinho, R. A. und Greider, C. W. (1997): Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA, *Cell* (Band 91), Nr. 1, Seite 25-34.
- [43] Chang, B. D.; Broude, E. V.; Dokmanovic, M.; Zhu, H.; Ruth, A.; Xuan, Y.; Kandel, E. S.; Lausch, E.; Christov, K. und Roninson, I. B. (1999): A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents, *Cancer Res* (Band 59), Nr. 15, Seite 3761-7.
- [44] Lundberg, A. S.; Hahn, W. C.; Gupta, P. und Weinberg, R. A. (2000): Genes involved in senescence and immortalization, *Curr Opin Cell Biol* (Band 12), Nr. 6, Seite 705-9.
- [45] Shelton, D. N.; Chang, E.; Whittier, P. S.; Choi, D. und Funk, W. D. (1999): Microarray analysis of replicative senescence, *Curr Biol* (Band 9), Nr. 17, Seite 939-45.
- [46] Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. und et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 20, Seite 9363-7.
- [47] Sherr, C. J. und DePinho, R. A. (2000): Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?, *Cell* (Band 102), Nr. 4, Seite 407-10.
- [48] Harvey, M.; Sands, A. T.; Weiss, R. S.; Hegi, M. E.; Wiseman, R. W.; Pantazis, P.; Giovanella, B. C.; Tainsky, M. A.; Bradley, A. und Donehower, L. A. (1993): In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice, *Oncogene* (Band 8), Nr. 9, Seite 2457-67.
- [49] Dimri, G. P.; Itahana, K.; Acosta, M. und Campisi, J. (2000): Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 1, Seite 273-85.
- [50] Malumbres, M.; Perez De Castro, I.; Hernandez, M. I.; Jimenez, M.; Corral, T. und Pellicer, A. (2000): Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b), *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 8, Seite 2915-25.
- [51] Pearson, M.; Carbone, R.; Sebastiani, C.; Cioce, M.; Fagioli, M.; Saito, S.; Higashimoto, Y.; Appella, E.; Minucci, S.; Pandolfi, P. P. und Pelicci, P. G. (2000): PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras, *Nature* (Band 406), Nr. 6792, Seite 207-10.
- [52] Sage, J.; Mulligan, G. J.; Attardi, L. D.; Miller, A.; Chen, S.; Williams, B.; Theodorou, E. und Jacks, T. (2000): Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 23, Seite 3037-50.
- [53] Binder, R. L.; Johnson, G. R.; Gallagher, P. M.; Stockman, S. L.; Sundberg, J. P. und Conti, C. J. (1998): Squamous cell hyperplastic foci: precursors of cutaneous papillomas induced in SENCAR mice by a two-stage carcinogenesis regimen, *Cancer Res* (Band 58), Nr. 19, Seite 4314-23.
- [54] Lin, A. W. und Lowe, S. W. (2001): Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 9, Seite 5025-30.
- [55] Lin, A. W.; Barradas, M.; Stone, J. C.; van Aelst, L.; Serrano, M. und Lowe, S. W. (1998): Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 19, Seite 3008-19. URL: <http://www.genesdev.org/cgi/content/full/12/19/3008>

- [56] Ko, L. J. und Prives, C. (1996): p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 9, Seite 1054-72.
- [57] Vogelstein, B.; Lane, D. und Levine, A. J. (2000): Surfing the p53 network, *Nature* (Band 408), Nr. 6810, Seite 307-10.
- [58] Evan, G. I. und Vousden, K. H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature* (Band 411), Nr. 6835, Seite 342-8.
- [59] Parada, L. F.; Land, H.; Weinberg, R. A.; Wolf, D. und Rotter, V. (1984): Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation, *Nature* (Band 312), Nr. 5995, Seite 649-51.
- [60] Eliyahu, D.; Michalovitz, D.; Eliyahu, S.; Pinhasi-Kimhi, O. und Oren, M. (1989): Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 86), Nr. 22, Seite 8763-7.
- [61] Hermeking, H. und Eick, D. (1994): Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53, *Science* (Band 265), Nr. 5181, Seite 2091-3.
- [62] Symonds, H.; Krall, L.; Remington, L.; Saenz-Robles, M.; Lowe, S.; Jacks, T. und Van Dyke, T. (1994): p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo, *Cell* (Band 78), Nr. 4, Seite 703-11.
- [63] Ferbeyre, G.; de Stanchina, E.; Querido, E.; McCurrach, M. E.; Hannon, G. und Lowe, S. W. (2002): Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence, *Mol. Cell. Biol.* (Band 22), Nr. 10, Seite 3497-508.
- [64] Tyner, S. D.; Venkatachalam, S.; Choi, J.; Jones, S.; Ghebranious, N.; Igelmann, H.; Lu, X.; Soron, G.; Cooper, B.; Brayton, C.; Hee Park, S.; Thompson, T.; Karsenty, G.; Bradley, A. und Donehower, L. A. (2002): p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes, *Nature* (Band 415), Nr. 6867, Seite 45-53.
- [65] Ruas, M. und Peters, G. (1998): The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, *Biochim Biophys Acta* (Band 1378), Nr. 2, Seite F115-77.
- [66] Sherr, C. J. (2001): The INK4a/ARF network in tumour suppression, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 10, Seite 731-7.
- [67] Palmero, I.; Pantoja, C. und Serrano, M. (1998): p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras, *Nature* (Band 395), Nr. 6698, Seite 125-6.
- [68] Radfar, A.; Unnikrishnan, I.; Lee, H. W.; DePinho, R. A. und Rosenberg, N. (1998): p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 22, Seite 13194-9.
- [69] Zindy, F.; Eischen, C. M.; Randle, D. H.; Kamijo, T.; Cleveland, J. L.; Sherr, C. J. und Roussel, M. F. (1998): Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 15, Seite 2424-33.
- [70] Pomerantz, J.; Schreiber-Agus, N.; Liegeois, N. J.; Silverman, A.; Alland, L.; Chin, L.; Potes, J.; Chen, K.; Orlow, I.; Lee, H. W.; Cordon-Cardo, C. und DePinho, R. A. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53, *Cell* (Band 92), Nr. 6, Seite 713-23.
- [71] Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C. W.; Chessa, L.; Smorodinsky, N. I.; Prives, C.; Reiss, Y.; Shiloh, Y. und Ziv, Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, *Science* (Band 281), Nr. 5383, Seite 1674-7.
- [72] Matsuoka, S.; Huang, M. und Elledge, S. J. (1998): Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase, *Science* (Band 282), Nr. 5395, Seite 1893-7.
- [73] Westphal, C. H.; Rowan, S.; Schmaltz, C.; Elson, A.; Fisher, D. E. und Leder, P. (1997): atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity, *Nat Genet* (Band 16), Nr. 4, Seite 397-401.
- [74] de Stanchina, E.; McCurrach, M. E.; Zindy, F.; Shieh, S. Y.; Ferbeyre, G.; Samuelson, A. V.; Prives, C.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. und Lowe, S. W. (1998): E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 15, Seite 2434-42.
- [75] Kamijo, T.; van de Kamp, E.; Chong, M. J.; Zindy, F.; Diehl, J. A.; Sherr, C. J. und McKinnon, P. J. (1999): Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function, *Cancer Res*

(Band 59), Nr. 10, Seite 2464-9.

- [76] Sakaguchi, K.; Herrera, J. E.; Saito, S.; Miki, T.; Bustin, M.; Vassilev, A.; Anderson, C. W. und Appella, E. (1998): DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 18, Seite 2831-41.
- [77] Miyashita, T. und Reed, J. C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell* (Band 80), Nr. 2, Seite 293-9.
- [78] Attardi, L. D.; Reczek, E. E.; Cosmas, C.; Demicco, E. G.; McCurrach, M. E.; Lowe, S. W. und Jacks, T. (2000): PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 6, Seite 704-18.
- [79] Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T. und Tanaka, N. (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* (Band 288), Nr. 5468, Seite 1053-8.
- [80] Oda, K.; Arakawa, H.; Tanaka, T.; Matsuda, K.; Tanikawa, C.; Mori, T.; Nishimori, H.; Tamai, K.; Tokino, T.; Nakamura, Y. und Taya, Y. (2000): p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53, *Cell* (Band 102), Nr. 6, Seite 849-62.
- [81] Nakano, K. und Vousden, K. H. (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell* (Band 7), Nr. 3, Seite 683-94.
- [82] Schuler, M. und Green, D. R. (2001): Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem Soc Trans* (Band 29), Nr. Pt 6, Seite 684-8.
- [83] Pan, G.; O'Rourke, K. und Dixit, V. M. (1998): Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 10, Seite 5841-5.
- [84] Soengas, M. S.; Alarcon, R. M.; Yoshida, H.; Giaccia, A. J.; Hakem, R.; Mak, T. W. und Lowe, S. W. (1999): Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition, *Science* (Band 284), Nr. 5411, Seite 156-9.
- [85] Dulic, V.; Kaufmann, W. K.; Wilson, S. J.; Tlsty, T. D.; Lees, E.; Harper, J. W.; Elledge, S. J. und Reed, S. I. (1994): p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell* (Band 76), Nr. 6, Seite 1013-23.
- [86] Hermeking, H.; Lengauer, C.; Polyak, K.; He, T. C.; Zhang, L.; Thiagalingam, S.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1997): 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol Cell* (Band 1), Nr. 1, Seite 3-11.
- [87] Hahn, W. C.; Counter, C. M.; Lundberg, A. S.; Beijersbergen, R. L.; Brooks, M. W. und Weinberg, R. A. (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements, *Nature* (Band 400), Nr. 6743, Seite 464-8.
- [88] Bardeesy, N.; Beckwith, J. B. und Pelletier, J. (1995): Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations, *Cancer Res* (Band 55), Nr. 2, Seite 215-9.
- [89] Gaidano, G.; Ballerini, P.; Gong, J. Z.; Inghirami, G.; Neri, A.; Newcomb, E. W.; Magrath, I. T.; Knowles, D. M. und Dalla-Favera, R. (1991): p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 12, Seite 5413-7.
- [90] Newcomb, E. W. (1995): P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance, *Leuk Lymphoma* (Band 17), Nr. 3-4, Seite 211-21.
- [91] Preudhomme, C.; Dervite, I.; Wattel, E.; Vanrumbeke, M.; Flactif, M.; Lai, J. L.; Hecquet, B.; Coppin, M. C.; Nelken, B.; Gosselin, B. und et al. (1995): Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases, *J Clin Oncol* (Band 13), Nr. 4, Seite 812-20.
- [92] Neubauer, A.; He, M.; Schmidt, C. A.; Huhn, D. und Liu, E. T. (1993): Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques, *Leukemia* (Band 7), Nr. 4, Seite 593-600.
- [93] Drexler, H. G. (1998): Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells, *Leukemia* (Band 12), Nr. 6, Seite 845-59.
- [94] Hollstein, M.; Shomer, B.; Greenblatt, M.; Soussi, T.; Hovig, E.; Montesano, R. und Harris,

- C. C. (1996): Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucleic Acids Res* (Band 24), Nr. 1, Seite 141-6.
- [95] Schutte, M.; Hruban, R. H.; Geradts, J.; Maynard, R.; Hilgers, W.; Rabindran, S. K.; Moskaluk, C. A.; Hahn, S. A.; Schwarte-Waldhoff, I.; Schmiegel, W.; Baylin, S. B.; Kern, S. E. und Herman, J. G. (1997): Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 15, Seite 3126-30.
- [96] Rampino, N.; Yamamoto, H.; Ionov, Y.; Li, Y.; Sawai, H.; Reed, J. C. und Perucho, M. (1997): Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science* (Band 275), Nr. 5302, Seite 967-9.
- [97] Gardie, B.; Cayuela, J. M.; Martini, S. und Sigaux, F. (1998): Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 91), Nr. 3, Seite 1016-20.
- [98] Jacobs, J. J.; Keblusek, P.; Robanus-Maandag, E.; Kristel, P.; Lingbeek, M.; Nederlof, P. M.; van Welsem, T.; van de Vijver, M. J.; Koh, E. Y.; Daley, G. Q. und van Lohuizen, M. (2000): Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers, *Nat Genet* (Band 26), Nr. 3, Seite 291-9.
- [99] Pinyol, M.; Hernandez, L.; Martinez, A.; Cobo, F.; Hernandez, S.; Bea, S.; Lopez-Guillermo, A.; Nayach, I.; Palacin, A.; Nadal, A.; Fernandez, P. L.; Montserrat, E.; Cardesa, A. und Campo, E. (2000): INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene, *Am J Pathol* (Band 156), Nr. 6, Seite 1987-96.
- [100] Soengas, M. S.; Capodieci, P.; Polsky, D.; Mora, J.; Esteller, M.; Opitz-Araya, X.; McCombie, R.; Herman, J. G.; Gerald, W. L.; Lazebnik, Y. A.; Cordon-Cardo, C. und Lowe, S. W. (2001): Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma, *Nature* (Band 409), Nr. 6817, Seite 207-11.
- [101] Eischen, C. M.; Roussel, M. F.; Korsmeyer, S. J. und Cleveland, J. L. (2001): Bax Loss Impairs Myc-Induced Apoptosis and Circumvents the Selection of p53 Mutations during Myc-Mediated Lymphomagenesis, *Mol Cell Biol* (Band 21), Nr. 22, Seite 7653-62.
- [102] Moller, M. B.; Ino, Y.; Gerdes, A. M.; Skjodt, K.; Louis, D. N. und Pedersen, N. T. (1999): Aberrations of the p53 pathway components p53, MDM2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma, *Leukemia* (Band 13), Nr. 3, Seite 453-9.
- [103] Vaux, D. L.; Cory, S. und Adams, J. M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre-B cells, *Nature* (Band 335), Nr. 6189, Seite 440-2.
- [104] Strasser, A.; Harris, A. W.; Bath, M. L. und Cory, S. (1990): Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature* (Band 348), Nr. 6299, Seite 331-3.
- [105] Searle, J.; Lawson, T. A.; Abbott, P. J.; Harmon, B. und Kerr, J. F. (1975): An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells, *J Pathol* (Band 116), Nr. 3, Seite 129-38.
- [106] Lotem, J. und Sachs, L. (1993): Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents, *Blood* (Band 82), Nr. 4, Seite 1092-6.
- [107] Lowe, S. W.; Schmitt, E. M.; Smith, S. W.; Osborne, B. A. und Jacks, T. (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes [see comments], *Nature* (Band 362), Nr. 6423, Seite 847-9.
- [108] Fan, S.; el-Deiry, W. S.; Bae, I.; Freeman, J.; Jondle, D.; Bhatia, K.; Fornace, A. J., Jr.; Magrath, I.; Kohn, K. W. und O'Connor, P. M. (1994): p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents, *Cancer Res* (Band 54), Nr. 22, Seite 5824-30.
- [109] Lowe, S. W.; Bodis, S.; McClatchey, A.; Remington, L.; Ruley, H. E.; Fisher, D. E.; Housman, D. E. und Jacks, T. (1994): p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo, *Science* (Band 266), Nr. 5186, Seite 807-10.

- [110] Hawkins, D. S.; Demers, G. W. und Galloway, D. A. (1996): Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 4, Seite 892-8.
- [111] Weinstein, J. N.; Myers, T. G.; O'Connor, P. M.; Friend, S. H.; Fornace, A. J., Jr.; Kohn, K. W.; Fojo, T.; Bates, S. E.; Rubinstein, L. V.; Anderson, N. L.; Buolamwini, J. K.; van Osdol, W. W.; Monks, A. P.; Scudiero, D. A.; Sausville, E. A.; Zaharevitz, D. W.; Bunow, B.; Viswanadhan, V. N.; Johnson, G. S.; Wittes, R. E. und Paull, K. D. (1997): An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer, *Science* (Band 275), Nr. 5298, Seite 343-9.
- [112] O'Connor, P. M.; Jackman, J.; Bae, I.; Myers, T. G.; Fan, S.; Mutoh, M.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Sausville, E. A.; Weinstein, J. N.; Friend, S.; Fornace, A. J., Jr. und Kohn, K. W. (1997): Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 19, Seite 4285-300.
- [113] Amundson, S. A.; Myers, T. G.; Scudiero, D.; Kitada, S.; Reed, J. C. und Fornace, A. J., Jr. (2000): An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 21, Seite 6101-10.
- [114] Fujiwara, T.; Grimm, E. A.; Mukhopadhyay, T.; Zhang, W. W.; Owen-Schaub, L. B. und Roth, J. A. (1994): Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene, *Cancer Res* (Band 54), Nr. 9, Seite 2287-91.
- [115] Blagosklonny, M. V. und El-Deiry, W. S. (1998): Acute overexpression of wt p53 facilitates anticancer drug-induced death of cancer and normal cells, *Int J Cancer* (Band 75), Nr. 6, Seite 933-40.
- [116] el Rouby, S.; Thomas, A.; Costin, D.; Rosenberg, C. R.; Potmesil, M.; Silber, R. und Newcomb, E. W. (1993): p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression, *Blood* (Band 82), Nr. 11, Seite 3452-9.
- [117] Wattel, E.; Preudhomme, C.; Hecquet, B.; Vanrumbeke, M.; Quesnel, B.; Dervite, I.; Morel, P. und Fenaux, P. (1994): p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies, *Blood* (Band 84), Nr. 9, Seite 3148-57.
- [118] Dohner, H.; Fischer, K.; Bentz, M.; Hansen, K.; Benner, A.; Cabot, G.; Diehl, D.; Schlenk, R.; Coy, J.; Stilgenbauer, S. und et al. (1995): p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias, *Blood* (Band 85), Nr. 6, Seite 1580-9.
- [119] Aas, T.; Borresen, A. L.; Geisler, S.; Smith-Sorensen, B.; Johnsen, H.; Varhaug, J. E.; Akslen, L. A. und Lonning, P. E. (1996): Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients, *Nat Med* (Band 2), Nr. 7, Seite 811-4.
- [120] Ichikawa, A.; Kinoshita, T.; Watanabe, T.; Kato, H.; Nagai, H.; Tsushita, K.; Saito, H. und Hotta, T. (1997): Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma, *N Engl J Med* (Band 337), Nr. 8, Seite 529-34.
- [121] Wilson, W. H.; Teruya-Feldstein, J.; Fest, T.; Harris, C.; Steinberg, S. M.; Jaffe, E. S. und Raffeld, M. (1997): Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas, *Blood* (Band 89), Nr. 2, Seite 601-9.
- [122] Navaratnam, S.; Williams, G. J.; Rubinger, M.; Pettigrew, N. M.; Mowat, M. R.; Begleiter, A. und Johnston, J. B. (1998): Expression of p53 predicts treatment failure in aggressive non-Hodgkin's lymphomas, *Leuk Lymphoma* (Band 29), Nr. 1-2, Seite 139-44.
- [123] Moller, M. B.; Gerdes, A. M.; Skjodt, K.; Mortensen, L. S. und Pedersen, N. T. (1999): Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B- and T-cell non-Hodgkin's lymphoma, *Clin Cancer Res* (Band 5), Nr. 5, Seite 1085-91.
- [124] Kamesaki, S.; Kamesaki, H.; Jorgensen, T. J.; Tanizawa, A.; Pommier, Y. und Cossman, J. (1993): bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair [published erratum appears in *Cancer Res* 1994 Jun 1;54(11):3074], *Cancer Res* (Band 53), Nr. 18, Seite 4251-6.

- [125] Miyashita, T. und Reed, J. C. (1993): Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line, *Blood* (Band 81), Nr. 1, Seite 151-7.
- [126] Hermine, O.; Haioun, C.; Lepage, E.; d'Agay, M. F.; Briere, J.; Lavignac, C.; Fillet, G.; Salles, G.; Marolleau, J. P.; Diebold, J.; Reyas, F. und Gaulard, P. (1996): Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non- Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA), Blood* (Band 87), Nr. 1, Seite 265-72.
- [127] Gascoyne, R. D.; Adomat, S. A.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Horsman, D. E.; Tolcher, A. W.; O'Reilly, S. E.; Hoskins, P.; Coldman, A. J.; Reed, J. C. und Connors, J. M. (1997): Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma, *Blood* (Band 90), Nr. 1, Seite 244-51.
- [128] Uckun, F. M.; Yang, Z.; Sather, H.; Steinherz, P.; Nachman, J.; Bostrom, B.; Crotty, L.; Sarquis, M.; Ek, O.; Zeren, T.; Tubergen, D.; Reaman, G. und Gaynon, P. (1997): Cellular expression of antiapoptotic BCL-2 oncoprotein in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group Study, *Blood* (Band 89), Nr. 10, Seite 3769-77.
- [129] Friess, H.; Lu, Z.; Andren-Sandberg, A.; Berberat, P.; Zimmermann, A.; Adler, G.; Schmid, R. und Buchler, M. W. (1998): Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer, *Ann Surg* (Band 228), Nr. 6, Seite 780-7.
- [130] Levenson, V. V.; Davidovich, I. A. und Roninson, I. B. (2000): Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 18, Seite 5027-30.
- [131] King, K. L. und Cidlowski, J. A. (1995): Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death, *J Cell Biochem* (Band 58), Nr. 2, Seite 175-80.
- [132] Lock, R. B. und Stribinskiene, L. (1996): Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 17, Seite 4006-12.
- [133] Hendry, J. H. und West, C. M. (1997): Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response, *Int J Radiat Biol* (Band 71), Nr. 6, Seite 709-19.
- [134] Finkel, E. (1999): Does cancer therapy trigger cell suicide?, *Science* (Band 286), Nr. 5448, Seite 2256-8.
- [135] Di Leonardo, A.; Linke, S. P.; Clarkin, K. und Wahl, G. M. (1994): DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts, *Genes Dev* (Band 8), Nr. 21, Seite 2540-51.
- [136] Waldman, T.; Zhang, Y.; Dillehay, L.; Yu, J.; Kinzler, K.; Vogelstein, B. und Williams, J. (1997): Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy, *Nat Med* (Band 3), Nr. 9, Seite 1034-6.
- [137] Scherf, U.; Ross, D. T.; Waltham, M.; Smith, L. H.; Lee, J. K.; Tanabe, L.; Kohn, K. W.; Reinhold, W. C.; Myers, T. G.; Andrews, D. T.; Scudiero, D. A.; Eisen, M. B.; Sausville, E. A.; Pommier, Y.; Botstein, D.; Brown, P. O. und Weinstein, J. N. (2000): A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer, *Nat Genet* (Band 24), Nr. 3, Seite 236-44. URL:
http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v3/n3/full/ng0300_236.html
http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v3/n3/abs/ng0300_236.html
- [138] Staunton, J. E.; Slonim, D. K.; Coller, H. A.; Tamayo, P.; Angelo, M. J.; Park, J.; Scherf, U.; Lee, J. K.; Reinhold, W. O.; Weinstein, J. N.; Mesirov, J. P.; Lander, E. S. und Golub, T. R. (2001): Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 19, Seite 10787-10792.
- [139] Brown, J. M. und Wouters, B. G. (1999): Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents, *Cancer Res* (Band 59), Nr. 7, Seite 1391-9.
- [140] Yin, D. X. und Schimke, R. T. (1995): BCL-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells, *Cancer Res* (Band 55), Nr. 21, Seite 4922-8.

- [141] Han, J. W.; Dionne, C. A.; Kedersha, N. L. und Goldmacher, V. S. (1997): p53 status affects the rate of the onset but not the overall extent of doxorubicin-induced cell death in rat-1 fibroblasts constitutively expressing c-Myc, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 1, Seite 176-82.
- [142] Kyprianou, N.; King, E. D.; Bradbury, D. und Rhee, J. G. (1997): bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells, *Int J Cancer* (Band 70), Nr. 3, Seite 341-8.
- [143] Milner, A. E.; Grand, R. J.; Vaughan, A. T.; Armitage, R. J. und Gregory, C. D. (1997): Differential effects of BCL-2 on survival and proliferation of human B-lymphoma cells following gamma-irradiation, *Oncogene* (Band 15), Nr. 15, Seite 1815-22.
- [144] Walker, A.; Taylor, S. T.; Hickman, J. A. und Dive, C. (1997): Germinal center-derived signals act with Bcl-2 to decrease apoptosis and increase clonogenicity of drug-treated human B lymphoma cells, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 10, Seite 1939-45.
- [145] Taylor, S. T.; Hickman, J. A. und Dive, C. (1999): Survival signals within the tumour microenvironment suppress drug-induced apoptosis: lessons learned from B lymphomas, *Endocr Relat Cancer* (Band 6), Nr. 1, Seite 21-3.
- [146] Coussens, L. M.; Tinkle, C. L.; Hanahan, D. und Werb, Z. (2000): MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis, *Cell* (Band 103), Nr. 3, Seite 481-90.
- [147] Mudry, R. E.; Fortney, J. E.; York, T.; Hall, B. M. und Gibson, L. F. (2000): Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy, *Blood* (Band 96), Nr. 5, Seite 1926-32. URL: <http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/96/5/1926>
<http://www.bloodjournal.org/cgi/content/abstract/96/5/1926>
- [148] Vaupel, P. und Hockel, M. (2000): Blood supply, oxygenation status and metabolic microenvironment of breast cancers: characterization and therapeutic relevance, *Int J Oncol* (Band 17), Nr. 5, Seite 869-79.
- [149] Schmitt, C. A. und Lowe, S. W. (1999): Apoptosis and therapy, *J Pathol* (Band 187), Nr. 1, Seite 127-37.
- [150] Schmitt, C. A.; Wallace-Brodeur, R. R.; Rosenthal, C. T.; McCurrach, M. E. und Lowe, S. W. (2000): DNA damage responses and chemosensitivity in the E μ -myc mouse lymphoma model, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (Band LXV), Seite 499-510.
- [151] Adams, J. M.; Harris, A. W.; Pinkert, C. A.; Corcoran, L. M.; Alexander, W. S.; Cory, S.; Palmiter, R. D. und Brinster, R. L. (1985): The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature* (Band 318), Nr. 6046, Seite 533-8.
- [152] Harris, A. W.; Pinkert, C. A.; Crawford, M.; Langdon, W. Y.; Brinster, R. L. und Adams, J. M. (1988): The E μ -myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells, *J Exp Med* (Band 167), Nr. 2, Seite 353-71.
- [153] Knudson, A. G., Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 68), Nr. 4, Seite 820-3.
- [154] Schmitt, C. A.; McCurrach, M. E.; de Stanchina, E.; Wallace-Brodeur, R. R. und Lowe, S. W. (1999): INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 20, Seite 2670-7.
- [155] Schmitt, C. A.; Rosenthal, C. T. und Lowe, S. W. (2000): Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas, *Nat Med* (Band 6), Nr. 9, Seite 1029-35.
- [156] Schmitt, C. A. und Lowe, S. W. (2001): Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E μ -myc lymphomas in vivo, *Blood Cells Mol Dis* (Band 27), Nr. 1, Seite 206-16.
- [157] Schmitt, C. A. und Lowe, S. W. (2001): Programmed cell death is critical for drug response in vivo, *Drug Resist Updat* (Band 4), Nr. 2, Seite 132-4.
- [158] Schmitt, C. A. und Lowe, S. W. (2002): Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models, *J Mol Med* (Band 80), Seite 137-146.
- [159] Schmitt, C. A.; Yang, M.; Fridman, J. S.; Baranov, E.; Hoffman, R. M. und Lowe, S. W. (2002): Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo, *Cancer Cell* (Band 1), Nr. 3, Seite 289-98.

- [160] Schmitt, C. A.; Fridman, J. S.; Yang, M.; Lee, S.; Baranov, E.; Hoffman, R. M. und Lowe, S. W. (2002): A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy, *Cell* (Band 109), Seite 335-46.
- [161] Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, *Cell* (Band 100), Nr. 1, Seite 57-70.
- [162] Hahn, W. C. und Weinberg, R. A. (2002): Modelling the molecular circuitry of cancer, *Nat Rev Cancer* (Band 2), Nr. 5, Seite 331-41.
- [163] Fearhead, H. O.; McCurrach, M. E.; O'Neill, J.; Zhang, K.; Lowe, S. W. und Lazebnik, Y. A. (1997): Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 10, Seite 1266-76.
- [164] Nahle, Z.; Polyakova, J.; McCurrach, M. E.; Davuluri, R. V.; Narita, M.; Jacobson, M. D.; Zhang, M. Q.; Lazebnik, Y.; Bar-Sagi, D. und Lowe, S. W. (2002): Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F, *Nat. Cell Biol.*, Seite In press.
- [165] Pinyol, M.; Cobo, F.; Bea, S.; Jares, P.; Nayach, I.; Fernandez, P. L.; Montserrat, E.; Cardesa, A. und Campo, E. (1998): p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas, *Blood* (Band 91), Nr. 8, Seite 2977-84.
- [166] Maloney, K. W.; McGavran, L.; Odom, L. F. und Hunger, S. P. (1999): Acquisition of p16(INK4A) and p15(INK4B) gene abnormalities between initial diagnosis and relapse in children with acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 93), Nr. 7, Seite 2380-5.
- [167] Carter, T. L.; Watt, P. M.; Kumar, R.; Burton, P. R.; Reaman, G. H.; Sather, H. N.; Baker, D. L. und Kees, U. R. (2001): Hemizygous p16(INK4A) deletion in pediatric acute lymphoblastic leukemia predicts independent risk of relapse, *Blood* (Band 97), Nr. 2, Seite 572-4.
- [168] Sander, C. A.; Yano, T.; Clark, H. M.; Harris, C.; Longo, D. L.; Jaffe, E. S. und Raffeld, M. (1993): p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas, *Blood* (Band 82), Nr. 7, Seite 1994-2004.
- [169] Elenitoba-Johnson, K. S.; Gascoyne, R. D.; Lim, M. S.; Chhanabai, M.; Jaffe, E. S. und Raffeld, M. (1998): Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma, *Blood* (Band 91), Nr. 12, Seite 4677-85.
- [170] Dohner, H.; Stilgenbauer, S.; Benner, A.; Leupolt, E.; Krober, A.; Bullinger, L.; Dohner, K.; Bentz, M. und Lichter, P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med* (Band 343), Nr. 26, Seite 1910-6.
- [171] Sjogren, S.; Inganas, M.; Norberg, T.; Lindgren, A.; Nordgren, H.; Holmberg, L. und Bergh, J. (1996): The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry, *J Natl Cancer Inst* (Band 88), Nr. 3-4, Seite 173-82.
- [172] Chang, B. D.; Xuan, Y.; Broude, E. V.; Zhu, H.; Schott, B.; Fang, J. und Roninson, I. B. (1999): Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs, *Oncogene* (Band 18), Nr. 34, Seite 4808-18.
- [173] te Poele, R. H.; Okorokov, A. L.; Jardine, L.; Cummings, J. und Joel, S. P. (2002): DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Res* (Band 62), Nr. 6, Seite 1876-83. URL:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/62/6/1876>
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/62/6/1876>
- [174] Nakamura, M.; Sakaki, T.; Hashimoto, H.; Nakase, H.; Ishida, E.; Shimada, K. und Konishi, N. (2001): Frequent alterations of the p14(ARF) and p16(INK4a) genes in primary central nervous system lymphomas, *Cancer Res* (Band 61), Nr. 17, Seite 6335-9. URL:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/61/17/6335>
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/17/6335>
- [175] Golub, T. R.; Slonim, D. K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J. P.; Collier, H.; Loh, M. L.; Downing, J. R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D. und Lander, E. S. (1999): Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression

monitoring, *Science* (Band 286), Nr. 5439, Seite 531-7.

- [176] Alizadeh, A. A.; Eisen, M. B.; Davis, R. E.; Ma, C.; Lossos, I. S.; Rosenwald, A.; Boldrick, J. C.; Sabet, H.; Tran, T.; Yu, X.; Powell, J. I.; Yang, L.; Marti, G. E.; Moore, T.; Hudson, J., Jr.; Lu, L.; Lewis, D. B.; Tibshirani, R.; Sherlock, G.; Chan, W. C.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Armitage, J. O.; Warnke, R.; Staudt, L. M. und et al. (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature* (Band 403), Nr. 6769, Seite 503-11.
- [177] Devillard, E.; Bertucci, F.; Trempat, P.; Bouabdallah, R.; Loricod, B.; Giaconia, A.; Brousset, P.; Granjeaud, S.; Nguyen, C.; Birnbaum, D.; Birg, F.; Houlgatte, R. und Xerri, L. (2002): Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease, *Oncogene* (Band 21), Nr. 19, Seite 3095-102.
- [178] Rosenwald, A.; Wright, G.; Chan, W. C.; Connors, J. M.; Campo, E.; Fisher, R. I.; Gascoyne, R. D.; Muller-Hermelink, H. K.; Smeland, E. B.; Giltnane, J. M.; Hurt, E. M.; Zhao, H.; Averett, L.; Yang, L.; Wilson, W. H.; Jaffe, E. S.; Simon, R.; Klausner, R. D.; Powell, J.; Duffey, P. L.; Longo, D. L.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Sanger, W. G.; Dave, B. J.; Lynch, J. C.; Vose, J.; Armitage, J. O.; Montserrat, E.; Lopez-Guillermo, A.; Grogan, T. M.; Miller, T. P.; LeBlanc, M.; Ott, G.; Kvaloy, S.; Delabie, J.; Holte, H.; Krajci, P.; Stokke, T. und Staudt, L. M. (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma, *N Engl J Med* (Band 346), Nr. 25, Seite 1937-47.
- [179] Yeoh, E. J.; Ross, M. E.; Shurtleff, S. A.; Williams, W. K.; Patel, D.; Mahfouz, R.; Behm, F. G.; Raimondi, S. C.; Relling, M. V.; Patel, A.; Cheng, C.; Campana, D.; Wilkins, D.; Zhou, X.; Li, J.; Liu, H.; Pui, C. H.; Evans, W. E.; Naeve, C.; Wong, L. und Downing, J. R. (2002): Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling, *Cancer Cell* (Band 1), Nr. 2, Seite 133-43.

Abkürzungsverzeichnis

Apaf-1	Apoptosis protease activating factor 1
ARF	Alternate reading frame
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
bcl2	B cell lymphoma 2
bcl-xl	B cell lymphoma extra-long
BrdU	Bromodesoxyuridine
C9DN	Dominant-negative caspase 9
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
cDNA	complementary DNA
Chk	Check kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CTX	Cyclophosphamid
DNA	Desoxyribonucleic acid
GFP	Green-fluorescent protein
IAP	Inhibitor-of-apoptosis protein
IL-7	Interleukin-7
INK4	Inhibitor of CDK4
IRES	Internal ribosomal entry site
LOH	Loss of heterozygosity
MAP	Mitogen-activated protein (kinase)
MDR	Multi-drug resistance
MLLV	Mouse moloney leukemia virus
MSCV	Murine stem cell virus
PCR	Polymerase chain reaction
PIG	p53-induced genes
PML	Promyelocytic leukemia
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
SA- β -Gal	Senescence-associated β -galactosidase
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Dörken, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie des Virchow-Klinikums der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, der nicht nur in großzügiger Weise hervorragende Arbeitsbedingungen in Klinik und Forschung geschaffen hat, sondern dessen umfassendes Wissenschaftsverständnis in vielen intensiven Diskussionen meine Arbeit stimuliert, inspiriert und kritisch begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. S. W. Lowe, Deputy Director des Cold Spring Harbor Laboratory in New York, USA, danke ich als brillantem Wissenschaftler und großartigem Mentor für das Vertrauen, welches er in mich als Postdoktorand in seiner Arbeitsgruppe gesetzt hatte, und der mir in vielerlei Hinsicht Denk- und Handlungsprinzipien wissenschaftlicher Tätigkeit eindrucksvoll näher gebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. K.-H. Meyer zum Büschenfelde, emeritierter Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, bin ich für seine prägende Rolle als klinischem Lehrer und Ratgeber sowie die Ermöglichung einer fundierten wissenschaftlichen Ausbildung zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. W. G. Dippold, ehemaliger Leitender Oberarzt der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, und jetziger Direktor der Inneren Abteilung des St. Vincenz- und Elisabeth-Hospitals, Mainz, danke ich für seine richtungsweisende Rolle bei der Betreuung meiner Promotionsarbeit und nachhaltige klinische und wissenschaftliche Förderung.

Meinen Kolleginnen und Kollegen in Forschung und Klinik an der I. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, am Cold Spring Harbor Laboratory in New York und an der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie des Virchow-Klinikums der Charité in Berlin gebührt besonderer Dank für viele Jahre freundschaftlicher Zusammenarbeit, Weitergabe ihrer wertvollen Erfahrung an Krankenbett und „Bench“ und zahlreichen Diskursen, die mir oft eine wichtige Entscheidungshilfe gewesen sind.

Nationalen und internationalen Kooperationspartnern danke ich für wissenschaftliche Teamarbeit und die Verfügbarmachung von Expertisen und Materialien, ohne die viele Aspekte der bisherigen Forschungsarbeiten nicht hätten untersucht werden können.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe danke ich für ihren großen persönlichen Einsatz, die Entwicklung eines jungen Forschungslabors mit Teamgeist, wissenschaftlicher Leistung und hoher Motivation in einer sehr kollegialen Atmosphäre voranzubringen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe, der US-amerikanischen Leukemia & Lymphoma Society sowie der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung danke ich für ihre großzügige Unterstützung verschiedener Forschungsprojekte und Drittmittelfinanzierung von Stellen in meiner Arbeitsgruppe.

Großer Dank gebührt natürlich meiner Familie, die den bisherigen Weg erst ermöglichte und die mir trotz der damit verbundenen Belastungen immer unterstützend und hilfreich zur Seite stand.

Lebenslauf

Dr. med. Clemens A. Schmitt

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie

Charité-Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin

und Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin

Augustenburger Platz 1

13353 Berlin

Telefon: 030-450 553 687

Fax: 030-450 553 986

E-mail: clemens.schmitt@charite.de

Geburtsdatum: 11. Juli 1967

Geburtsort: Frankfurt am Main

Familienstand ledig

Studium der Humanmedizin:

1986 – 1993 Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Dissertation:

1990 – 1995 Expression und Regulation der membran-assoziierten Komplement-Inhibitoren CD46, CD55 und CD59 in normalen und malignen gastrointestinalen Geweben (magna cum laude); Prof. Dr. med. W. G. Dippold, I. Medizinische Klinik; Medizinische Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, 1995.

Klinische Tätigkeit:

1993 – 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h.c. K.-H. Meyer zum Büschenfelde); Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.

seit 08/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken); Charité-Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin.

Postdoktoranden-Forschungstätigkeit:

- 1995 – 1998 Forschungstätigkeit in den tumorimmunologischen Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. W. G. Dippold und Prof. Dr. med. Th. Wölfel; I. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h.c. K.-H. Meyer zum Büschenfelde); Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.
- 1998 – 2001 Forschungstätigkeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. S. W. Lowe (Apoptose, Zellzyklus-Regulation, Onkogene, Tumorsuppressoren, Chemoresistenz) am Cold Spring Harbor Laboratory (Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Watson), New York, USA.
- seit 08/2001 Arbeitsgruppenleiter an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken); Charité-Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin und dem Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin (Direktor: Prof. Dr. med. D. Ganten), Berlin.

Auszeichnungen:

- 1992 Graduierten-Förderungsstipendium der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.
- 1998 Zweijähriges Ausbildungsstipendium der Deutschen Krebshilfe/ Dr. Mildred Scheel Stiftung
- 1999 Tagungspreis der American Association of Cancer Research (AACR) auf der AACR Spezialkonferenz in Cancer Research "Cancer Biology and the Mutant Mouse: New Methods, New Models, New Insights" (Keystone/Colorado, USA; 02/1999).
- 2000 Tagungspreis der Keystone-Symposia in Molekular- und Zellbiologie auf der Konferenz „Cancer, Cell Cycle and Therapeutics" (Steamboat Springs/Colorado, USA; 01/2000).
- 2000 Fellowship (Special Fellow Award für dreijährigen Forschungszeitraum) der Leukemia & Lymphoma Society (of America).
- 2000 Tagungspreis des Institutio Juan March de Estudios e Investigaciones auf der Workshop-Konferenz „Tumor Suppressor Networks" (Madrid; 05/2000).
- 2000 American Association of Cancer Research (AACR)-Genentech Scholar in Training Award der AACR Spezialkonferenz „Mouse Models of Cancer" (La Jolla/ Kalifornien, USA; 11/2000)
- 2002 Förderpreis der Walter-Schulz-Stiftung zur Förderung der Medizinischen Forschung

Verbandsmitgliedschaften:

seit 2000 American Society of Cancer Research (AACR)

seit 2002 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
(DGHO)

Anhang

Originalarbeiten, die im Hauptteil angeführt wurden:

- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (1999). Apoptosis and therapy. *Journal of Pathology* 187: 127-37. [149]
- Clemens A. Schmitt, Rachel R. Wallace-Brodeur, Christine T. Rosenthal, Mila E. McCurrach, Scott W. Lowe (2000). DNA damage responses and chemosensitivity in the Eμ-myc mouse lymphoma model. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LXV: 499-510. [150]
- Clemens A. Schmitt, Mila E. McCurrach, Elisa de Stanchina, Rachel R. Wallace-Brodeur, Scott W. Lowe (1999). INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes & Development* 13: 2670-7. [154]
- Clemens A. Schmitt, Christine T. Rosenthal, Scott W. Lowe (2000). Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nature Medicine* 6: 1029-35. [155]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2001). Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary Eμ-myc lymphomas in vivo. *Blood, Cells, Molecules, and Diseases* 27: 206-16. [156]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2001). Programmed cell death is critical for drug response in vivo. *Drug Resistance Updates* 4: 132-4. [157]
- Clemens A. Schmitt, Scott W. Lowe (2002). Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *Journal of Molecular Medicine* 80: 137-46. [158]
- Clemens A. Schmitt, Jordan S. Fridman, Meng Yang, Eugene Baranov, Robert M. Hoffman, Scott W. Lowe (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1:289-98. [159]
- Clemens A. Schmitt, Jordan S. Fridman, Meng Yang, Soyoung Lee, Eugene Baranov, Robert M. Hoffman, Scott W. Lowe (2002). A senescence program controlled by p53 and p16^{INK4a} contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109: 335-346. [160]

Eidesstattliche Erklärung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind;
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind;
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

15. November 2002

Dr. med. Clemens Schmitt